DR. RER. NAT.
ROLAND SCHMIEDEL

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DES BILIRUBINS.

CANNSTATT 1912.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS

DES

BILIRUBINS

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

EINER

HOHEN NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER

EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT
ZU TÜBINGEN

VORGELEGT

VON

ROLAND SCHMIEDEL

AUS CANNSTATT.

ACAD.
LAND.BAT.
BIBL.

CANNSTATT
BUCHDRUCKEREI VON AUGUST DUSSLER
1912.

Von der Fakultät angenommen den 4. Mai 1912.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552715_0062

Vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Professor Dr. W. Küster im chem. Laboratorium der Kgl Tierärztl. Hochschule zu Stuttgart begonnen und im physiologisch-chem. Institut der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Professor Dr. Thierfelder beendigt.

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinen hochverehrten Lehrern: Herrn Professor Dr. W. Küster und Herrn Professor Dr. H. Thierfelder für die Unterstützung, die mir bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit in so reichem Maße zu Teil wurde, meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Der Verfasser.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

A. Einleitung 1
B. Experimenteller Teil 21
I. Gewinnung des Ausgangsmaterials 21
a) Die Aufarbeitung von Gallensteinen 21
b) Das Umkristallisieren des Rohbilirubins 26
II. Ueber die Salze des Bilirubins 28
III. Ueber die Methylierung des Bilirubins 42
IV. Ueber die Einwirkung gasförmiger Salzsäure auf Bilirubin . 45
V. Ueber die Spaltung des Bilirubins durch Säuren 46
1. Spaltung durch 25 %ige Salzsäure 46
2. Spaltung durch 25 %ige Schwefelsäure 48
VI. Ueber die Einwirkung von Alkali auf Bilirubin 50
1. Einwirkung wässeriger Kalilauge auf Bilirubin 50
2. Einwirkung von schmelzendem Aetzkali auf Bilirubin . . . 52
VII. Ueber Versuche, betr. die Azetylierung und Benzoylierung des Bilirubins 57
1. Azetylierung des Bilirubins 57
2. Benzoylierung des Bilirubins 59
VIII. Ueber die Oxydation des Bilirubins durch Chromsäure . . . 61
IX. Ueber die Oxydation des Bilirubins durch Eisenchlorid in Eisessig 64
1. Ueber das Dehydrooxybilirubin 68
a) Einwirkung von Alkali auf Dehydrooxybilirubin 69
b) Einwirkung von Cyankali auf Dehydrooxybilirubin . . . 72
c) Ueber die Salze des Dehydrooxybilirubins 74
2. Ueber das Bilinigrin 80

Beiträge zur Kenntnis des Bilirubins.

A. Einleitung.

Die spezifischen Bestandteile der Galle, die Gallensäuren und die Gallenfarbstoffe, haben von jeher das besondere Interesse der Forscher auf sich gelenkt. Doch ist es trotz zahlreicher Arbeiten, besonders der letzten Jahre, noch nicht geglückt, ihre chemische Natur völlig aufzuklären.

Die vorliegende Arbeit beschäfigt sich mit dem Bilirubin, also dem natürlichen Gallenfarbstoff, der bisher allein in kristallisiertem Zustande gewonnen werden konnte.

Das Bilirubin wird normalerweise in der Leber gebildet, und zwar als Stoffwechselprodukt der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffs, des Hämatins. Die Tatsache, daß sich Gallenfarbstoffe nur bei den Tieren, die Hämoglobin im Blute haben, finden, wies schon früh auf eine Verwandtschaft des Blutfarbstoffs mit dem Gallenfarbstoff hin. Die Annahme fand ihre Bestätigung auf biologischem Wege durch folgende Beobachtungen:

Im Jahre 1847 machte Virchow[1]) die Wahrnehmung, dass sich in alten Blutextravasaten ein kristallisierter Farbstoff fand und bezeichnete ihn als Hämatoidin. Robin[2]), Jaffé[3]) und Salkowski[4]) stellten dann die Identität desselben mit Bilirubin fest.

[1]) Virchows Archiv I pag. 379 und 407.
[2]) Charles Robin, Compt. rend. T. 41 pag. 506.
[3]) Virchows Archiv XXIII 192.
[4]) Hoppe-Seylers Med.-chem. Unters. Heft III. S. 436.

1870 beobachtete Langhans[1]), nachdem er Tauben Blut subkutan injiziert, dass nach einigen Tagen in dem subkutanen Gerinnsel statt Blutfarbstoff Bilirubin und Biliverdin auftraten.

Ähnliche Beobachtungen machte 1884 Quincke[2]) bei Hunden.

Von Recklinghausen[3]) sah im Jahre 1883, dass auch ausserhalb des Organismus Gallenfarbstoff im Blute von Fröschen nach 3—10 Tagen entsteht.

Den exakten chemischen Beweis für die Verwandtschaft des Bilirubins mit dem Hämatin konnte im Jahre 1897 W. Küster führen dadurch, daß beide Farbstoffe bei der Oxydation dieselben Säuren $C_8 H_9 O_4 N$ und $C_8 H_8 O_5$ gaben, die Hämatinsäuren. Doch machte sich hierbei auch gleich ein erheblicher Unterschied zwischen beiden Farbstoffen bemerklich. Während aus dem Hämatin ($C_{34} H_{32} O_4 N_4 Fe OH$) sich etwa 60 % rohe, aus dem Hämatophorphyrin $C_{34} H_{38} O_6 N_4$ 50 % reine Hämatinsäure isolieren lassen, erhält man aus dem Bilirubin nur etwa 30 %, d. h. hier ein Molekül, dort deren zwei.

Aus den Versuchen, die Konstitution des Blut- und Gallenfarbstoffes aufzuklären, haben sich sehr interessante Beziehungen zu einem Farbstoff ergeben, der im Haushalt der Pflanze eine sehr wichtige Rolle spielt, wie der Blutfarbstoff bei der Erhaltung des tierischen Lebens, zu dem Chlorophyll. Auch aus ihm erhält man — wie Marchlewsky zuerst beobachtet hat — bei der Oxydation Hämatinsäure, daneben entsteht das Imid der Methyläthylmaleinsäure (Willstätter[4]). Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied gegenüber dem Blutfarbstoff und eine Übereinstimmung mit dem Bilirubin. Während beim Hämatin die Oxydation bisher kein solches Imid lieferte, ist es mir gelungen, das Methyläthylmaleinimid aus dem Bilirubin zu erhalten, wenn auch nur in geringer Ausbeute.

---

[1]) Virchows Archiv Bd. 49 S. 66.
[2]) „ „ „ 95 S. 125.
[3]) Handbuch der allgemeinen Pathologie des Kreislaufes und der Ernährung. Stuttgart 1883 pag. 434.
[4]) Liebigs Annalen 227, 373.

Wenn es darnach auch den Anschein hat, als ob das Bilirubin dem Chlorophyll näher stehe als dem Hämatin, so ist doch auf Grund der erwähnten biologischen Experimente die Abstammung des Gallenfarbstoffes vom Blutfarbstoff als sicher anzunehmen, wie denn auch Pigmente, wie das Bilipurpurin von Loebisch und Fischler C_{32} H_{34} O_5 N_4 und das Phylloerythrin Marchlewskys[1] [2]), die nach letzterem übrigens identisch sein sollen und deren Zusammengehörigkeit mit dem Chlorophyll der Nahrung als erwiesen betrachtet werden kann, aus der Gallenblase nur dann isoliert werden können, wenn das Tier — es wurde mit einem Schaf operiert[3]) — frisches Gras als Nahrung bekam, und am besten aus den Fäces von Kühen zu erhalten ist.

Wie diese Umwandlung — jedenfalls handelt es sich um eine Oxydation — in der Zelle vor sich geht, kann jedoch erst nach Feststellung der chemischen Konstitution beider Farbstoffe klargelegt werden. Wenn es auch noch nicht gelungen ist, dieses Ziel zu erreichen, so geben die diesbezüglichen Versuche doch schon Anhaltspunkte, die eine Lösung der interessanten Frage in absehbarer Zeit möglich erscheinen lassen.

Wie das Bilirubin zur eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffs in Beziehung steht, so leiten sich andererseits einige der Harnpigmente vom Bilirubin ab. Durch die im Darmkanal vor sich gehenden Fäulnisprozesse tritt Reduktion ein und aus Bilirubin entsteht das Urobilinogen. Für die Richtigkeit dieser Ansicht brachte in neuester Zeit H. Fischer[4]) experimentelle Belege, indem er durch Reduktion von Bilirubin mit Natriumamalgam sein Hemibilirubin erhielt, dessen Identität mit dem Urobilinogen des Harns er sicher stellen

---

[1]) Bull. de l'Academ. des Sciences de Craevrie 1903 pag. 638

[2]) Sitzuugsberichte der K. Akademie der Wissenschatten Wien, 112, Abt. IIb 1903.

[3]) Bull. de l'Acad. des Sciences de Craevrie 1905 pag. 505, 743.

[4]) Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiolog. Chemie 75,232.

konnte. Andererseits kommen im Harn und in den Fäzes auch Farbstoffe vor, deren Abstammung vom Tryptophan des Eiweißes als sicher anzusehen ist, die sog. Skatolfarbstoffe. Da es aber nicht unwahrscheinlich ist, daß auch das Hämatin und das Bilirubin mit dem Tryptophan in Zusammenhang stehen, so dürfte der genetische Zusammenhang aller dieser Pigmente ausser Frage stehen.

Der Erforschung des in mehr wie einer Beziehung wichtigen Bilirubin's haben sich von jeher in sofern Schwierigkeiten in den Weg gestellt, als es sehr schwierig und kostspielig ist, größere Mengen des Farbstoffs zu beschaffen. Aus der Galle selbst läßt sich das Bilirubin nur in geringer Menge darstellen, in etwas größerer Ausbeute kann man es aus alter Leichengalle erhalten. Maly[2]) zeigte zuerst, daß sich zur Darstellung von Bilirubin am besten die Gallensteine, die sich in der Gallenblase des Rindes finden, eignen. In den menschlichen Gallensteinen findet sich nur wenig Bilirubin, in der Hauptsache Bilifuscin, wie Zumbusch[1]) gezeigt hat. Doch hat Städeler[3]) seine Untersuchungen mit menschlichen Gallensteinen ausgeführt und zuerst für das Bilirubin die Formel $C_{16}H_{18}O_3N_2$ aufgestellt. Die schwierige Beschaffung des Untersuchungsmaterials einerseits, andererseits die Wichtigkeit, das Vorhandensein von Gallenfarbstoff festzustellen, war auch der Grund, daß sich die meisten Forscher an qualitative Reaktionen für den Nachweis von Gallenfarbstoffen hielten.

Von den zum Nachweis von Gallenfarbstoffen vorgeschlagenen Methoden kommen hauptsächlich in Betracht:

I. Die Gmelin-Tiedemann'sche Reaktion. (1831.)

Dieselbe besteht darin, daß man das Untersuchungsmaterial (Urin usw.) mit Salpetersäure, die etwas salpetrige

---

[1]) Hoppe-Seyler's Zeitschrift, Band XXXI, 446.

[2]) Annalen, Band 132, S. 127 (1864).

[3]) Städeler, über die Farbstoffe der Galle. Annalen, Band 132, S. 323 (1864),

Säure enthält, unterschichtet. An der Berührungsstelle erhält man eine Reihe farbiger Ringe, die der Reihe nach grün, blau, violett, rot, rotgelb werden. Dieses Farbenspiel wird der allgemeinen Ansicht nach durch eine Oxydation des Gallenfarbstoffs hervorgerufen, doch könnte sehr wohl auch ein Nitrosoprodukt z. B. die rote Phase vorstellen, wie denn das Indol durch Verwandlung in das intensiv rot gefärbte Nitrosoindol in Spuren bereits nachgewiesen werden kann. Sonst ist über das Wesen der Gmelin'schen Reaktion wenig bekannt, vor allem ist es noch nicht gelungen, eines der Oxydationsprodukte zu fassen und chemisch zu charakterisieren. Doch glaube ich, in dem durch gelinde Oxydation von Bilirubin mit Eisenchlorid in essigsaurer Lösung erhaltenen Dehydrooxybilirubin den Körper in Händen zu haben, der die erste Oxydationsstufe bei der Gmelin'schen Reaktion darstellt; durch weitere Oxydation mit Salpetersäure geht das Dehydrooxybilirubin in einen roten Farbstoff über. Gewöhnlich wurde die grüne Oxydationsstufe einfach als Biliverdin angesprochen. Das Biliverdin entsteht jedoch aus Bilirubin nur durch Oxydation in alkalischer Lösung, während das Dehydrooxybilirubin das erste grüne Oxydationsprodukt des Bilirubins ist, das aus saurer Lösung entsteht.

II. Die Ehrlich'sche Diazo-Reaktion

wird derart ausgeführt, daß man zu dem den Farbstoff enthaltenden Chloroform-Auszug einige ccm einer Lösung von 1,0 g Sulfanilsäure 15,0 ccm Salzsäure und 500 ccm Wasser und einige Tropfen Natriumnitritlösung 1 : 200 fügt und durch Zusatz von Alkohol für völlige Mischung sorgt. Bei Anwesenheit von Bilirubin tritt dunkelrote Farbe ein, die auf Zusatz von Eisessig in blauviolett übergeht. Über den Chemismus dieser Reaktion haben Orndorf und Teeple[1]) Auf-

[1]) W. R. Orndorf und J. E. Teeple. On Bilirubin, the red colouring matter of the bile. Americ. Chem. Journal Vol. 26, pag. 86, Vol. 33, pag. 215.

Dieselben. Beiträge zur wissenschaftlichen Medizin und Chemie. Salkowski. — Festschrift 1904, S. 301.

klärung gebracht, denen es gelang, Azofarbstoffe des Bilirubins herzustellen.

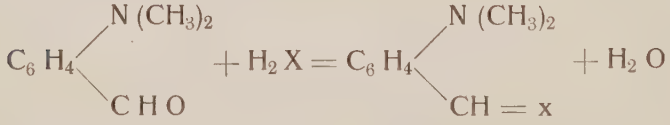
Durch Behandeln von Bilirubin mit Tribromdiazobenzolsulfat erhielten sie ein Gemisch von Monazo- und Disazofarbstoffen, die sich durch Essigester trennen lassen, in dem sich das Disazoprodukt löst. Monoazobilirubin löst sich mit roter Farbe, Disazobilirubin mit schön purpurner in Kalilauge.

Über den Ort des Eintritts des Diazokörpers ist allerdings noch nichts bekannt.

III. Die Ehrlich'sche Aldehyd-Reaktion.[1]

Diese Reaktion bezieht sich nicht auf Bilirubin selbst, sondern auf Urobilinogen, das ja durch Reduktion des Bilirubins im Darmkanal entsteht. Sie beruht auf der von Ehrlich gemachten Beobachtung, daß gewisse pathologische Urine in saurer Lösung mit p-Dimethylamidobenzaldehyd versetzt, eine intensive Rotfärbung geben.

Nach Pröscher[2]) verläuft die Reaktion im Sinne folgender Gleichung:



indem die Aldehydgruppe wahrscheinlich mit einer Methylen- oder Amidogruppe des unbekannten Körpers reagiert. Bei der Analyse des Kondensationsproduktes, das sich bei der Reaktion bildet, erhielt er Werte, die auf die Formel $C_{16}\ H_{24}\ O_6\ N_2$ stimmten. Aus diesem Kondensationsprodukt $C_{16}\ H_{24}\ O_6\ N_2$ berechnet er die Formel des unbekannten Körpers, der mit dem Aldehyd die Kondensation eingeht, zu $C_7\ H_{15}\ O_6\ N$ $C_{16}\ H_{24}\ O_6\ N_2 - C_9\ H_{11}\ N\ O + H_2\ O = C_7\ H_{15}\ O_6\ N$.

---

[1]) Die medizinische Woche 1901 No. 15.

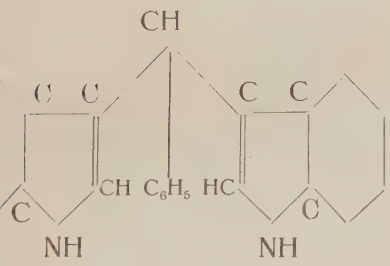
[2]) Zeitschrift für physiolog. Chemie Bd. 31, pag. 521.

Er vermutet, daß der Körper $C_7 H_{15} O_6 N$ ein Formylglukosanin oder ein Acetylderivat des noch unbekannten Pentosamins darstellt.

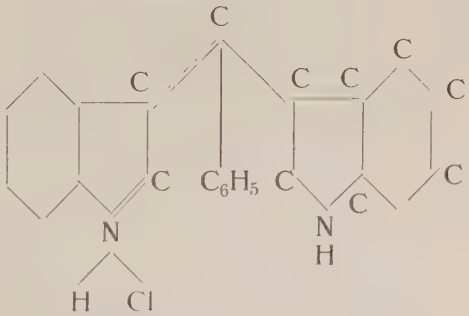
Später hat O. Neubauer[1]) festgestellt, daß das Urobilinogen des Urins die Ursache dieser Reaktion sei. Hämopyrrol und Pyrrol selbst geben eine ähnliche Reaktion.

In jüngster Zeit konnte H. Fischer[2]) endlich zeigen, daß der Mechanismus dieser Reaktion durchaus nicht so einfach ist, wie die bisherigen Forscher annahmen, sondern daß zuerst ein farbloser Körper entsteht, der erst secundär in den Farbstoff übergeht.

Er stellte damit eine Analogie mit dem Kondensationsprodukte fest, das zuerst E. Fischer und Wagner[3]) aus α-Methylindol (Methylketol) beim Erhitzen mit Benzoylchlorid und Chlorzink erhielten und als zur Klasse der Indylindolidenphenylmethanderivate gehörend erkannt hatten, dessen Leukobasen „Diindylphenylmethane" entsprechen und von denen nur die ersteren befähigt sind, Salze zu bilden.



Diindylphenylmethansalz.



Salz des Indolidenindylphenylmethans.

---

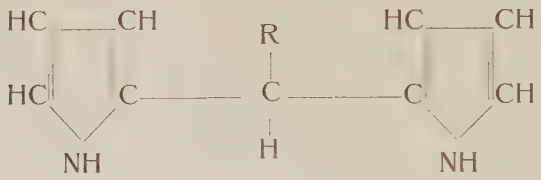
[1]) Sitzungsberichte der Gesellschaft für Morphol. und Physiologie. München 1903.

[2]) H. Fischer u. Fr. Meyer-Betz. Zeitschrift f. physiol. Chemie Bd. 75, pag. 232.

[3]) Berichte 20, pag. 815 (1887).

Freund und Lebach[1]), von denen die eben gebrauchte Nomenklatur herrührt, haben denn auch Kondensationsprodukte aus einem Molekül Indol und einem Molekül Aldehyd beschrieben.

Endlich hat Feist[2]) Kondensationsprodukte von Pyrrolen mit Aldehyden beschrieben, die ein analoges Verhalten aufweisen; er erkannte sie als Dipyrrylarylmethanderivate der Formel



Sie zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Leukobasen der Triphenylmethanderivate; sie gehen z. B. bei der Oxydation in gefärbte Verbindungen über.

Entsprechend erhielt H. Fischer (loc. cit.) durch Kondensation von 2,5 Dimethylpyrrol-3-carbonsäureester mit p-Dimethylaminobenzaldehyd einen Leukofarbstoff; er geht durch Oxydation mit Eisenchlorid in einen Farbstoff über, der im Farbton und in der Intensität der Färbung dem reinen Fuchsin entspricht. Einen ähnlichen Farbstoff konnte er durch Kondensation seines Hemibilirubins mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und darauffolgende Oxydation mit Eisenchlorid erhalten. Fischer stellte fest, daß die Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd alle nicht stabilen Pyrrole geben, d. h. die Pyrrole, die ein an einem Ringkohlenstoffatom nicht substituiertes H-Atom besitzen.

Als solche Pyrrole erwiesen sich alle durch Reduktion erhaltenen Blut- und Gallenfarbstoffderivate, also Hämopyrrol, Phonopyrrolcarbonsäure. Bilirubin selbst gibt die Ehrlichsche

---

[1]) Berichte 38, pag. 2640 (1905).

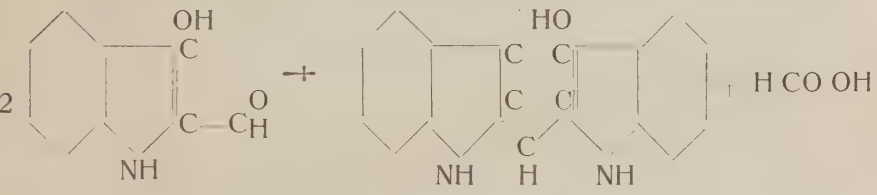
[2]) Berichte 35, pag. 1647.

Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd nicht, es stellt also wahrscheinlich ein tetrasubstituiertes Pyrrol dar.

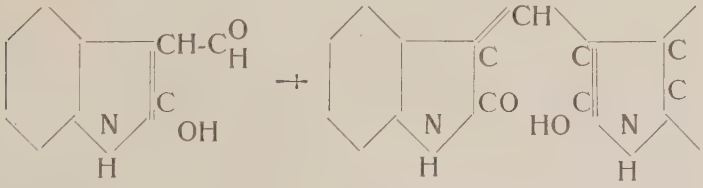
Die nicht stabilen Pyrrole gehen sowohl bei der freiwilligen Zersetzung im Reagensrohr, als auch im Organismus in urobilinähnliche Körper über.

Neuerdings ist nun auch die Klasse der Diindylmethanderivate resp. der Indylindolidenmethanderivate bekannt geworden und zwar durch Ellinger und Flamand.[1])

König[2]) erhielt solche Körper namentlich durch Kondensation von Orthoameisensäureester mit Indolen unter dem Einfluß von Säuren. Namentlich aber interessiert die von Friedländer[3]) gemachte Beobachtung, wonach die Aldehyde des Indoxyls, Oxindols und Oxythionaphtens, unter dem Einfluß von Mineralsäuren unter Abspaltung von Ameisensäure in die erwähnte Körperklasse übergehen. So liefert Indoxylaldehyd:



Allerdings handelt es sich hier um einen Eingriff in die α-Stellung, dem Königschen Produkte müssen die aus Oxindolaldehyd entsprechenden Farbstoffe entsprechen:



[1]) Ellinger und Flamand hielten ihr Produkt für ein Triindylmethanderivat; aus den Arbeiten von König und Friedländer geht aber hervor, daß diese Annahme irrtümlich gewesen ist.

[2]) Berichte 11/2, 957. J. f. prakt. Chemie [2] 84.

[3]) Berichte 44, 3098.

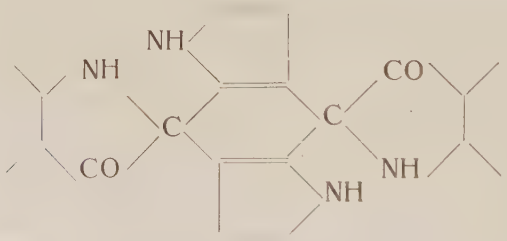
Wichtig sind nun diese Farbstoffe, weil sie durch den Aldehyd des Indoxyls mit dem Indigo in Beziehung stehen, der durch die Einwirkung von Alkali neben Anthranilsäure jenen Aldehyd liefert[1]). Es wäre aber nicht unmöglich, daß manche Farbstoffe des Harns, für welche die Zugehörigkeit zur Klasse der Indylmethanabkömmlinge wahrscheinlich gemacht werden konnte, z. B. das Urorosein, auf dem angedeuteten Wege aus Indigo hervorgehen, oder aber aus dem Bilirubin, auf dessen Ähnlichkeit mit dem Indigo ich noch zu sprechen komme. Endlich mag noch darauf hingewiesen werden, daß das Hämatin nach der Annahme von W. Küster und Lacour[2]) ebenfalls zur Klasse der Pyrrol-Pyrrolidenmethanderivate gehören soll.

Eine weitere Klasse von Pyrrolfarbstoffen wird durch die Kondensationsprodukte von Isatin und seinen Derivaten mit Pyrrol repräsentiert.[3])

Die Konstitution dieser von Liebermann als Pyrrolblau A und B beschriebenen Produkte ist nicht endgültig festgelegt. Nach Liebermann kämen folgende Formeln in Betracht: Pyrrolblau A C_{24} H_{18} O_3 N_4

„ B C_{24} H_{18} O_2 N_4

In Bezug auf die chemische Konstitution besitzen die Gruppen des Pyrrolblaus denselben Bau wie die Indophenine, nämlich:



[1]) Friedländer, Berichte 43, 1971 (1910).

[2]) Dissertation, Tübingen 1907. — Berichte der deutschen pharm. Gesellsch. 1911, 507.

[3]) Liebermann und Hase, Berichte 1905 Bd. III, 2847. 1907 Bd. II, 2492.

Was nun die Schlüsse, die die genannten qualitativen Reaktionen auf die chemische Konstitution des Bilirubins gestatten, betrifft, so gibt die 1. (Gmelin'sche) Reaktion keinen Aufschluß über den molekularen Bau des Bilirubins. Wie schon erwähnt, glaube ich in meinem Dehydrooxybilirubin den Körper in Händen zu haben, der die erste (grüne) Phase bei der Oxydation darstellt, da es der erste bekannte, grüne Gallenfarbstoff ist, der sich aus saurer Lösung bildet. In der empirischen Zusammensetzung unterscheidet sich der neue Farbstoff von Biliverdin durch das Fehlen der Elemente des Wassers; ferner löst sich Biliverdin leicht und vollständig in Alkohol, während dies beim Dehydrooxybilirubin nicht der Fall ist.

An welchem Ort bei der Oxydation des Bilirubins mit Eisenchlorid in essigsaurer Lösung das Atom Sauerstoff eintritt, konnte bis jetzt noch nicht festgestellt werden. Die Aufspaltung des Dehydrooxybilirubins durch Säuren gestaltet sich nicht einfacher, als die des Bilirubins, ebenso läßt sich durch Alkalien $^1/_4$ des Stickstoffs als Ammoniak abspalten.

Einen besseren Einblick in die Constitution des Bilirubins als die Gmelin'sche Probe gestattet die unter II. angeführte Ehrlich'sche Diazo-Reaktion. Sie könnte z. B. als eine Bestätigung der schon durch andere Reaktionen, wie die Fichtenspahnreaktion, die Entstehung der Hämatinsäuren bei der Oxydation, ferner durch die Möglichkeit, Bromsubstitutionsprodukte zu erhalten, bewiesenen Tatsache herangezogen werden, daß Bilirubin ein Pyrrolderivat ist, nachdem von O. Fischer und Hepp[2]) die Fähigkeit des Pyrrols, gleich den Phenolen, Azofarbstoffe zu geben, entdeckt worden war. So fand denn auch Marchlewski[1]), daß Hämopyrrol sehr leicht mit Diazoniumsalzen reagiert unter Bildung von Azofarbstoffen, deren Chlorhydrate sehr gut kristallisieren. So erhielt er z. B. ein Hämopyrroldisazodibenzolchlorhydrat $C_8 H_{11} N (N_2 C_6 H_5)_2 . H Cl$.

[1]) Berichte der deutschen chem. Gesellschaft 19, 2251 (1886).
[2]) Zeitschrift für physiol. Chemie 43, 415.

An welcher Stelle des Moleküls beim Bilirubin die Diazotierung eintritt, ist bis jetzt allerdings noch nicht entschieden.

Es ist wohl sicher nicht ausgeschlossen, daß sie an anderer Stelle eintritt als z. B. beim Hämopyrrol; denn während beim Hämopyrrol die unter III. genannte qualitative Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd eintritt, versagt sie beim Bilirubin. Daraus geht aber hervor, daß im Pyrrolring des Bilirubins eine Substitution nicht mehr eintreten kann, oder daß kein an einem Pyrrolkohlenstofftatom haftendes Wasserstoffatom vorhanden ist. Wenn es trotzdem dieselben beiden Pyrrolringe sind, die im Urobilinogen mit dem p-Dimethylaminobenzaldehyd reagieren, so kann es im Bilirubin sich nur um eine Ersetzung des Imidwasserstoffs durch eine Diazogruppe handeln[1]), da ja Bilirubin mit obigem Aldehyd nicht reagiert und damit zeigt, daß am Kohlenstoff jener beiden Pyrrolringe eine Substitution nicht mehr eintreten kann.[2])

Wenn die Fichtenspahnreaktion mit dem Bilirubin eintritt, die nach Willstätter[3]) auch auf einer Kondensation mit den Aldehyden des Holzes beruht, so ist dies wohl darauf zurückzuführen, daß beim Glühen eine weitgehende Zerlegung eintritt. Ganz analog wird bei der Schmelze mit Ätzkali ein Pyrrol frei gemacht, das mit Quecksilberchlorid eine Doppelverbindung gibt. Nach Willstätters[4]) Versuchen geben aber tetrasubstituierte Pyrrole, wie das Phyllopyrrol $C_9 H_{15} N$ keine Quecksilberchloridquecksilberdoppelsalze. Durch die Schmelze mit Kali tritt also eine derartige Zerlegung des Bilirubins

[1]) cf. Marchlewsky, Berichte 11/2. Anz. Akad. d. Wissenschaften Krakau 1911, Reihe A 345.

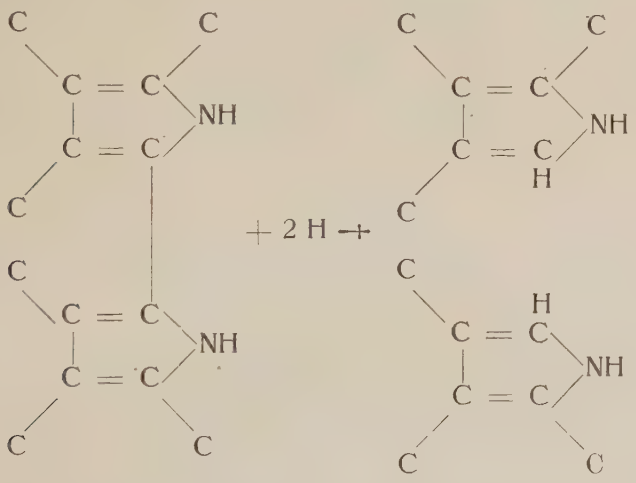
[2]) Anmerkung. Daraus, daß keine intensive Färbung erfolgt, ist übrigens noch gar nicht gesagt, daß auch keine Kondensation eintritt, da erst die sekundären Produkte Farbstoffe sind, deren Bildung auf einer Oxydation und Umlagerung beruht, zu der das Molekül nur befähigt ist, wenn mindestens an dem einen Stickstoff der beiden an der Kondensation beteiligten Pyrrolringe noch ein Wasserstoff haftet.

[3]) Willstätter, Untersuchungen über Chlorophyll, Annalen 385, 194.

[4]) Willstätter, Untersuchungen über Chlorophyll, Annalen 385, S. 18 ff.

ein, daß ein nicht stabiles Pyrrol resultiert, während das Bilirubin selbst zu den stabilen Pyrrolen zu zählen ist.

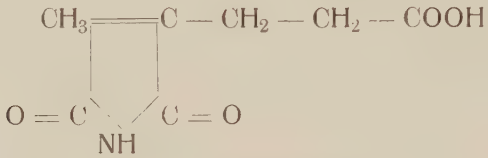
So gibt die unter III. genannte Reaktion einen wertvollen Fingerzeig für die Konstitution des Bilirubins und des Urobilinogens, das aus jenem durch Reduktion hervorgeht. Durch die Anlagerung von Wasserstoff werden zwei im Bilirubin miteinander verbundene Ringe, wahrscheinlich zwei Pyrrolringe. getrennt.[1])



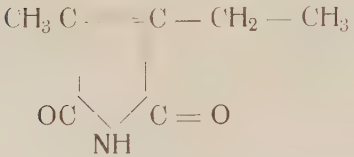
Daß aber im Bilirubin zwei Pyrrolringe vorliegen, ist durch folgende Tatsache bewiesen: Bei der Oxydation bei niederer Temperatur wird 1 Molekül Hämatinsäure abgespalten, daneben aber auch, wenn auch in geringerer Ausbeute, Methyläthylmaleinsäure, wie ich nachweisen konnte. Ferner er-

[1]) Unter Berücksichtigung der in der Anmerkung auf voriger Seite gemachten Schlüsse wäre auch an die Möglichkeit zu denken, daß im Bilirubin zwei Stickstoffatome miteinander verbunden sind, also keinen Wasserstoff mehr tragen. Eine solche Bindung würde erklären, daß beim Bilirubin bis jetzt komplexe Salze noch nicht sicher nachgewiesen sind, bei denen ja Wasserstoff am Stickstoff durch Metall ersetzt ist, während das Hemibilirubin durch ein komplexes Kupfersalz charakterisiert ist.

hielt H. Fischer[1]) bei der Oxydation des Hemibilirubins 9 % Hämatinsäure und 5 % Methyläthylmaleinimid, während er beim Bilirubin nur Hämatinsäure und keine Methyläthylmaleinsäure bekam.



Imid der Hämatinsäure.



Imid der Methyläthylmaleinsäure.

Beide Körper gehen aber aus Pyrrolringen hervor und beide Komplexe sind — so ähnlich ihre Konstitution auch ist — als unabhängig voneinander anzusehen, da bei der Oxydation von Hämatinsäure eine Bildung von Methyläthylmaleinsäureimid bisher nicht beobachtet worden ist. Darnach ist mit dem Nachweis vom Auftreten der beiden erwähnten Imide das Vorhandensein von zwei Pyrrolringen im Bilirubin bewiesen.

Durch das Entstehen von Methyläthylmaleinsäure zeigt das Bilirubin größere Ähnlichkeit mit dem Chlorophyll als mit dem Hämatin. Willstätter[2]) erhielt aus Chlorophyllderivaten dialkylierte Maleinsäuren in guter Ausbeute, während das Hämatin bis jetzt nur Hämatinsäure lieferte. Vielleicht wird es möglich sein, auch aus Hämatin oder Hämatoporphyrin

[1]) H. Fischer und P. Meyer. Zeitschrift für physiol. Chemie 75, pag. 339.

[2]) Liebigs Annalen 373, 227, 382, 171, 190.

dadurch obiges Imid zu erhalten, daß man es erst reduziert und dann oxydiert.

H. Fischer[1]) nahm zuerst an, daß sein Hemibilirubin die eine Hälfte des Bilirubin-Moleküls verkörpere, da er es immer in Ausbeuten von 50 % erhielt und gab ihm die Formel

$$C_{16}\,H_{22}\,O_3\,N_2 \text{ oder } C_{16}\,H_{20}\,O_3\,N_2.$$

Durch Molekulargewichtsbestimmungen nach der Siedepunktserhöhung in absolutem Alkohol sah er sich zwar gezwungen, die verdoppelte Formel für das Hemibilirubin anzunehmen. Es fragt sich aber immer noch, ob hier nicht das verdoppelte (polymerisierte) halbe Molekül vorliegt. Denken wir uns das Bilirubin symmetrisch konstruiert:

$$\begin{array}{c} R—R' \\ | \quad | \\ R—R' \end{array}$$

wo zunächst einmal R einen Komplex von 8 C Atomen vorstellt, so könnte durch Reduktion die Trennung zwischen R und R′ eintreten und die Reste R—R sich wieder mit einem zweiten Paar R—R verbinden. Es ist nämlich eigentümlich, daß die gelinde Oxydation ganz ähnlich verläuft wie die gelinde Reduktion, insofern, als auch hier das schon erwähnte Dehydrooxybilirubin stets in Ausbeuten von 50 % erhalten wurde, und ebenso wie Fischer daneben einen Körper II bekam, erhielt ich als zweiten Körper ein wegen der schwarzen Farbe Bilinigrin genanntes Produkt, das in allen Lösungsmitteln schwer löslich ist. Die Analyse weist auf eine empirische Formel ($C_{16}\,H_{16}\,O_5\,N_.$) hin. Bemerkenswert ist, daß die Substanz fast unlösliche Salze mit Kalium und Natrium gibt, und daß eine ähnliche Eigenschaft den Resten von Gallenfarbstoff zukommt, die nach Extraktion des Bilirubins und Choleprasins aus den Gallensteinen zurückbleiben. Wahrscheinlich besteht das sogenannte Bilihumin früherer Autoren zum größten Teil aus jenem schwarzen Produkt.

---

[1]) H. Fischer, Zeitschrift für physiol. Chemie 73, pag. 204.

Eine Beobachtung spricht allerdings gegen die Annahme, daß im Dehydrooxybilirubin resp. Hemibilirubin nur die eine Hälfte des Bilirubin-Moleküls vorliege, nämlich die Tatsache, daß aus dem Dehydrooxybilirubin, wie aus dem Bilirubin nur $^1/_4$ des Gesamtstickstoffes durch Alkali oder Säuren abspaltbar ist.

Da dies unter den gleichen Bedingungen beim Hämatin nicht möglich ist und hier 4 Pyrrolringe nachgewiesen sind, so ist im Bilirubin jedenfalls ein Stickstoff in anderer Bindung als im Hämatin enthalten. Damit läßt sich vielleicht auch in Zusammenhang bringen, daß es mir nicht gelungen ist, komplexe Salze des Bilirubins herzustellen.[1]) Aus den dargestellten Metallsalzen, von denen außer dem Kaliumsalz keines in Alkohol oder Chloroform löslich war, läßt sich das Metall durch Säuren oder auch Alkalien stets leicht abspalten. Da, wo alle Bedingungen für das Entstehen von komplexen Salzen gegeben sind, wie z. B. bei der Darstellung des Dehydrooxybilirubins aus Bilirubin durch Eisenchlorid in Eisessig zur Bildung eines komplexen Eisensalzes[2]), blieb die Bildung von komplexen Salzen aus. Doch möchte ich die Beobachtung nicht unerwähnt lassen, daß ich durch Fällen einer Bilirubin-Kalium-Lösung mit alkoholischer Zinkacetatlösung ein Zinksalz mit beinahe vier Atomen Zink erhielt, das jedoch in Alkohol und Chloroform unlöslich war.

Auch in alkalischer Lösung nimmt Bilirubin kein Eisen auf, während Laidlaw zeigen konnte, daß aus Hämatoporphyrin und alkalischer Ferroammoniumsulfatlösung ein hämatinähnlicher Körper entsteht. Beim Chlorophyll bilden sich in saurer alkoholischer Lösung komplexe Salze des Eisens, Kupfers, Zinks, ähnlich wie beim Urobilin, das aus alkoholischer Lösung mit alkoholischer Zinkacetatlösung das charakteristische komplexe Zinksalz bildet.

---

[1]) Das Kupfersalz des Hemibilirubins löst sich in Chloroform.

[2]) Der Vorgang wäre analog der Entstehung von Zalevskis hydrogenisiertem Hämin.

Das Molekulargewicht des Bilirubins ist sicher noch nicht bewiesen. Orndorff und Teeple schließen aus dem Bestehen eines Monoazoproduktes ($C_{32} H_{35} O_6 N_4$) N_2 R auf die Formel $C_{32} H_{36} O_6 N_4$. Köster[1]) nimmt die einfache Formel $C_{16} H_{18} O_3 N_2$ an. Die von mir mit Hilfe des Methylesters ausgeführten Molekulargewichtsbestimmungen aus der Siedepunktserhöhung in Chloroform scheinen auch für die einfache Formel zu sprechen. Für die verdoppelte Formel sprechen die zahlreichen Resultate, die ich aus den Salzen des Bilirubins erhalten habe.

Aus den oben angeführten Tatsachen lassen sich folgende Schlüsse auf die Konstitution des Bilirubins ziehen:

I. Von den vier Stickstoffatomen der Formel $C_{32} H_{36} O_6 N_4$ ist genaueres nur von dreien bekannt. Zwei Stickstoffatome sind als Pyrrolstickstoff vorhanden, eines lässt sich durch Alkali abspalten.

II. Von den sechs Sauerstoffatomen lässt sich ebenfalls nichts sicheres sagen. Gewöhnlich wird das Bilirubin als zweibasische Säure angegeben; damit wären vier Atome Sauerstoff erklärt. Aus der Bildung der Salze kann bis jetzt noch kein ganz sicherer Schluß gezogen werden auf die Basizität des Bilirubins. Schon Thudichum beobachtete[2]), daß 2 Reihen von Salzen des Bilirubins existieren. Auch meine Versuche geben keine auf 2 Carboxylgruppen genau stimmenden Werte, in der Regel ist der Metallgehalt etwas höher als für 2 Carboxyle berechnet, so beim Kazlium-, Baryum-, Zink- und Eisensalz. Städeler stellte ein Kalziumsalz her, das genau auf 2 Carboxyle stimmte, ebenso Köster.

Eigentümliche Verhältnisse herrschen beim Silbersalz. Hier gelingt es, fast 4 Atome Silber ins Molekül Bilirubin zu bringen, aber nur bei Verwendung frisch umkristallisierten

---

[1]) Dissertation Rostock.

[2]) Journal für prakt. Chemie 104, pag. 193 ff.

Bilirubins, während ein Produkt, das schon mehrere Jahre alt war, nur ungefähr 2 Atome Silber aufnahm, sodaß der Schluß gezogen werden kann, daß das Bilirubin beim Lagern eine intramolekulare Umlagerung erleidet, eine Ansicht, die auch durch die Beobachtung von H. Fischer gestützt wird, wonach das Hemibilirubin in einer aciden und einer nichtaciden Form existiert. Die bisher von W. Küster vertretene Ansicht, daß beim Lagern des Bilirubins eine Polymerisation eintritt, wodurch die Tatsache erklärt werden sollte, daß frisch umkristallisiertes Bilirubin sich leichter in Chloroform löst als abgelagertes, muß demnach wohl modifiziert werden.

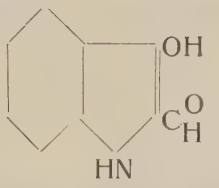
Vielleicht kann der höhere Metallgehalt mancher Salze auch daher rühren, daß sich Metall an den Stickstoff lagert, doch steht hiefür der Beweis noch aus. Allerdings sind Anzeichen dafür da, daß sich z. B. ein komplexes Zinksalz mit beinahe 4 Atomen Zink bilden kann.

Anderen als Carboxylsauerstoff, also Hydroxyl-Aldehyd- oder Ketogruppen im Bilirubin nachzuweisen, ist bis jetzt und auch mir nicht gelungen.

Bei der Aufspaltung des Bilirubins durch Alkali tritt ein mit Wasserdampf flüchtiger Körper auf, der reduzierende Eigenschaften besitzt und als ein Aldehyd angesprochen werden kann, da er z. B. durch Natriumbisulfit seiner ätherischen Lösung entzogen werden kann. Leider gelang es bisher nicht, größere Mengen der Substanz herzustellen, um auf diese Weise einen neuen Beweis für die Aehnlichkeit der Struktur des Bilirubins mit dem Indigo zu gewinnen. Bekanntlich ist auf diese schon von Städeler hingewiesen worden; W. Küster stellte die auch durch Spaltung mittels Alkali aus dem Bilirubin entstehende Hämatinsäure in Parallele mit der aus dem Indigo unter ähnlichen Bedingungen hervorgehenden Anthranilsäure. Nun fand Friedländer[1]), daß sich neben dieser als

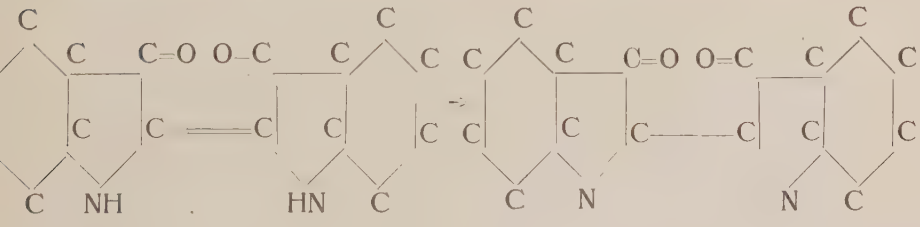
[1]) Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften Wien, Band CXVII, Abt. II b.

ein weiteres primäres Produkt der α-Aldehyd des β-oxyindols



bildet.

Wenn also auch das Bilirubin, wenigstens in einem Teil seines Moleküls, eine indigoïde Konstitution aufwiese, so sollte auch hier ein Aldehyd auftreten und zwar könnte es sich um einen Aldehyd des Pyrrols handeln, der voraussichtlich ein recht unbeständiger Körper sein wird. Jedenfalls aber zeigen alle Umsetzungen des Bilirubins einen noch komplizierteren Charakter als die des Indigos. Geht letzteres durch Aufnahme von 2 Atomen Wasserstoff in das Indigweiß über, aus dem sich durch Luftsauerstoff wieder Indigo bildet, so muß Bilirubin 6 Atome Wasserstoff aufnehmen, um einen farblosen Körper zu geben, der durch Aufnahme von Sauerstoff anscheinend nicht wieder Bilirubin liefert. Auch ist das farblose Hemibilirubin nicht das einzige Reaktionsprodukt. Dann zeigt das Bilirubin wieder Eigenschaften, die es dem Indigweiß an die Seite stellen, den Uebergang in das Biliverdin nämlich, bei dem unter Aufnahme von Sauerstoff eine Farbvertiefung stattfindet. Während Indigo endlich nach Kalb[1]) in wasserfreiem Medium durch Oxydation noch 2 Atome Wasserstoff verliert und allein den Dehydroindigo liefert, wobei durch Verschiebung der Doppelbindung eine Farbaufhellung eintritt,



[1]) L. Kalb, Berichte d. deutsch. Chem. Gesells. 42, 3642; 44, 1455.

trotzdem sich eine weitere Doppelbindung einstellt, bildet sich bei der Oxydation von Bilirubin in Eisessig mit Eisenchlorid unter Wegnahme von Wasserstoff und Aufnahme von Sauerstoff ein tiefer (grün) gefärbter Körper, aber nur zu ca. 50 %, während ein zweites bei dieser Reaktion entstehendes Produkt schwarz gefärbt erscheint.

Man kann also eine Parallele zwischen den beiden Farbstoffen nicht konstruieren, solange man die Gesamtformel in Anwendung bringt.

Es spricht vieles dafür, daß wir es im Bilirubin nicht wie im Indigo mit einem symmetrisch gebauten Molekül zu tun haben, sondern daß die beiden Hälften eine verschiedene Anordnung aufweisen, wahrscheinlich bereits bedingt durch die Anzahl der das Gerüst vorstellenden Kohlenstoffatome.

B. Experimenteller Teil.

I.

Gewinnung des Ausgangsmaterials.

a) Die Aufarbeitung von Rindergallensteinen.

Zur Darstellung des Bilirubins verfuhr ich nach der von W. Küster[1]) angegebenen Methode. Zum Unterschied von dem Verfahren Städelers wird hier statt Salzsäure Essigsäure verwendet, um die Bildung chlorierter Produkte zu verhindern.

Da aus der Galle selbst sich der rote Gallenfarbstoff in größerer Menge nur mühsam gewinnen läßt, wurden Gallensteine aus der Gallenblase des Rindes, die in reichlicher Menge Farbstoff enthielten, verwandt. Sie waren von ziegelroter Farbe, zeigten konzentrische Schichtung und hatten teilweise die Größe von Kastanien. Ich nahm 300 g Gallensteine in Arbeit, die zuerst vorsichtig bei 100° getrocknet worden waren. Dieselben wurden fein zerrieben und durch ein engmaschiges Netz getrieben. Das erhaltene Gallensteinpulver wurde in zwei Portionen geteilt, die getrennt verarbeitet wurden.

1. Zur Entfernung von Fett und Cholesterin wurde 24 Stunden lang im Soxleth'schen Extraktionsapparat mit Aether extrahiert. Für die nachfolgenden Filtrationen ist es von Bedeutung, daß diese Extraktion so lange fortgesetzt wird, bis auch wirklich alles Fett entfernt ist. Ist dies nicht der Fall, so verzögert sich die Aufarbeitung der Gallensteine

[1]) Zeitschrift für physiolog. Chemie Bd. 47, pag. 524 und 525.

durch langwieriges Filtieren sehr, was für die Qualität des Rohbilirubins immerhin von Bedeutung ist.

Im Laufe der Aufarbeitung der Gallensteine zeigte es sich, daß vorteilhaft an Stelle des Soxleht'schen Extraktionsapparates eine einfache, nach unten verjüngte Röhre angewendet wird, wie es H. Fischer[1]) beschrieben hat. Auf diese Weise wird der zu extrahierende Stoff von den Dämpfen des Lösungsmittels ausgezogen, so daß die Extraktionen gewöhnlich in der halben Zeit vollendet sind. Der durch die Aether-Extraktion verursachte Gewichtsverlust betrug 5,7 g und 6,4 g, also ca. 4 %.

2. Das entfettete, zuerst an der Luft, dann bei 100° getrocknete Gallensteinpulver wurde nun zur Entfernung der gallensauren Salze in zwei hohen Bechergläsern so lange mit siedendem Wasser dekantierend ausgewaschen, bis das Filtrat nur noch schwach gefärbt war. Der Verlust betrug 8,7 g resp. 8,0 g, also durchschnittlich 5,7 % des noch vorhandenen Pulvers.

3. Die je ca. 135 g betragenden Rückstände wurden nun weiter mit kochender, 10 %iger Essigsäure behandelt, um die Kalzium- und Magnesiumverbindungen der Farbstoffe zu zerlegen. Daß der Farbstoff in den Gallensteinen nicht frei vorkommt, erhellt daraus, daß das Gallensteinpulver vor der Behandlung mit Essigsäure so gut wie nichts an Chloroform abgibt. Die Behandlung mit verdünnter Essigsäure wurde so lange fortgesetzt, bis weder Kalzium noch Magnesium im Filtrat nachweisbar waren. Der Verlust betrug 27,0 g resp. 30,0 g, also ca. 21 % des noch vorhandenen Pulvers. Insgesamt waren also bis jetzt 85,8 g = 28,6 % extrahiert worden.[2])

---

[2]) Zeitschrift für physiol. Chemie 75, 232.

[3]) W. Küster fand diesen Anteil zu 28,11 % (Zeitschrift f. physiol. Chemie Bd. 26, pag. 316), Maly zu 24,78 % (Annalen Bd. 175, pag. 81), E. Niethammer zu 28,16 % (Dissertation, Tübingen 1907) des Gewichts der verwendeten Gallensteine.

4. Städeler machte nun die Beobachtung, daß das Gallensteinpulver, trotz der unter I erfolgten, erschöpfenden Extraktion mit Aether, nach der Behandlung mit Essigsäure wieder erhebliche Mengen von Fett an Aether abgibt. Ich extrahierte demnach, nachdem die Essigsäure durch Wasser weggewaschen war, einen Tag lang mit Aether. Der Gewichtsverlust betrug 3,2 g resp. 4,1 g, also 3,3 %, der Rest an Gallensteinpulver ca. 205 g, da immer geringe Mengen in den Extraktionshülsen hängen blieben.

5. Das zurückbleibende Pulver, zusammen 205 g, wurde nun im Schüttelapparat mit kaltem 96 %igem Alkohol behandelt, bis das Filtrat nur noch ganz schwach grün gefärbt war. Diese Operation nahm sechs Tage in Anspruch. Der Alkohol wurde immer wieder abdestilliert und zur nächsten Extraktion verwandt. Der Verlust betrug 5,0 g resp. 3,9 g, durchschnittlich also 4,3 %.

6. Als nächste Operation folgte nun die Herausnahme des Choleprasins durch heißen Eisessig. Zu diesem Zwecke wurde das Pulver je einer Hülse auf drei flache Porzellanschalen verteilt und mit 1 Liter kochendem Eisessig übergossen. Nach dem Erkalten wurde durch ein Kreppfilter filtriert und der Eisessig unter vermindertem Druck bis auf ungefähr $^1/_{10}$ seines Volumens abdestilliert. Diese Behandlung mit siedendem Eisessig wurde elfmal wiederholt.

Die nach Abdestillieren des Eisessigs zurückbleibende Lösung wurde zur Gewinnung des Choleprasins in das 10 bis 15fache Volumen Wasser eingetragen, dem etwas Ammoniak zugegeben war. Der erhaltene Schlamm wurde auf einem Filter gesammelt, säurefrei gewaschen und getrocknet. Es wurden insgesamt 42,0 g Rohcholeprasin = 21,4 % [1]) erhalten.

[1]) Anmerkung. Dasselbe enthält etwas Bilirubin; extrahiert man nämlich das rohe Choleprasin mit Chloroform, so gehen nicht unbedeutende Mengen eines grün gefärbten Produktes in Lösung, das nach Behandlung mit Eisessig Bilirubin zurücklässt. Bilirubin und Choleprasin halten sich also gegenseitig in Lösung.

7. Das zurückbleibende Gallensteinpulver, ca. 155 g, wurde nun erst mit Wasser, dann mit Alkohol gewaschen und bei 60° getrocknet. Bei der nun folgenden dritten Behandlung mit Aether trat ein kleiner Verlust von 0,5 g resp. 0,6 g ein.

8. Als nächste Operation folgte wieder eine Extraktion mit kaltem Alkohol, wobei je 1,0 g herausgelöst wurde.

9. Jetzt ist das Gallensteinpulver so weit vorbereitet, daß das Bilirubin mit Chloroform herausgezogen werden kann. Die Extraktion wird zweckmäßig nicht im Soxleht-Apparat, sondern in der schon erwähnten Röhre, vor Licht geschützt, vorgenommen; denn während bei Verwendung des Soxlehtschen Extraktionsapparates immerhin acht Tage vergingen, bis aller Farbstoff extrahiert war, lief bei Verwendung der Extraktionsröhre schon am dritten Tag das Chloroform nahezu farblos ab. Ein Teil des Farbstoffes setzt sich im Extraktionskolben ab (Fraktion I), aus der darüber stehenden Lösung kann durch teilweises Abdestillieren des Chloroforms eine neue Menge Farbstoff gewonnen werden (Fraktion II). Durch Zusatz von Alkohol kann aus dem Filtrat ein, allerdings ziemlich dunkel gefärbter, Farbstoff erhalten werden, der sich jedoch als chlorhaltig erweist (Fraktion III).

Die Ausbeuten betrugen:

	Hülse I	Hülse II
Fraktion I	10,2 g	9,5 g
„ II	3,0 g	3,7 g
„ III	1,8 g	1,4 g

Das mit Chloroform erschöpfend behandelte Pulver wurde nun wiederum mit 10 %iger Essigsäure, dann mit Äther, Alkohol, heißem Eisessig, Äther, Alkohol behandelt, wie unter 3 bis 9 angegeben. Der hiernach erhaltene Farbstoff betrug

	Hülse I	Hülse II
Fraktion I	4,1 g	4,0 g
„ II	1,2 g	1,4 g
„ III	0,5 g	0,6 g.

Noch dreimal wurde die ganze Behandlung wiederholt und es wurden zusammen erhalten:

	Hülse I	Hülse II
Fraktion I	3,0 g	3,3 g
„ II	1,0 g	0,9 g
„ III	0,6 g	0,7 g

Die Gesamtausbeuten betrugen demnach:

Fraktion I	17,3 g	16,8 g
„ II	5,2 g	6,0 g
„ III	2,9 g	2,7 g

Nach all' den beschriebenen Operationen war noch ungefähr ein Drittel (ca. 110 g) des in Arbeit genommenen Gallensteinpulvers übrig, doch war es auch nach intensiver Behandlung mit siedendem Eisessig nicht mehr möglich, durch Chloroform Farbstoff herauszuziehen. Doch gibt das schwarze, gewöhnlich als Bilihumin bezeichnete Pulver sehr deutlich die Gmelin'sche Gallenfarbstoff-Reaktion. Der Aschegehalt des schwarzen Rückstandes ist gering; er beträgt 3,8 % und besteht hauptsächlich aus Kalzium und Phosphorsäure, neben geringen Mengen Eisen. Auch der Stickstoffgehalt spricht dafür, daß der Rest noch aus Gallenfarbstoff besteht. Reines Bilirubin enthält 9,8 % Stickstoff; die Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl in dem schwarzen Rückstand ergaben 9,0 % resp. 9,3 % Stickstoff.

0,3490 g Substanz lieferten 22,5 ccm $\frac{n}{10}$ NH_3 = 9,0 % N.

0,2990 g Substanz lieferten 20,0 ccm $\frac{n}{10}$ NH_3 = 9,3 % N.

Läßt man auf das schwarze Pulver in der Hitze 25 %ige Salzsäure einwirken, so wird, genau wie beim Bilirubin, ungefähr $\frac{1}{4}$ des Gesamtstickstoffes als Ammoniak abgespalten. Die Stickstoffbestimmungen nach der Behandlung mit 25 %iger Salzsäure ergaben:

0,4790 g Substanz lieferten 25,5 ccm $\frac{n}{10}$ NH_3 = 7,4 % N.

0,4590 g Substanz lieferten 24,5 ccm $\frac{n}{10}$ NH_3 = 7,8 % N.

Durch Einwirkung von Natriumkarbonat in der Hitze läßt sich aus dem Rückstand etwas brauner Gallenfarbstoff herauslösen; gleichzeitig bildet sich jedoch auch ein schwer lösliches Natriumsalz mit einem Na-Gehalt von 6,7 %. Die Bildung dieses schwer löslichen Natriumsalzes weist darauf hin, daß der Rückstand wohl zum größten Teil aus einem Gallenfarbstoff besteht, der in naher Beziehung steht zu dem durch gelinde Oxydation von Bilirubin mit Eisenchlorid in essigsaurer Lösung von mir erhaltenen Bilinigrin[1]), das durch ein schwerlösliches Natriumsalz C_{16} H_{15} Na O_5 N_2 mit einem Natriumgehalt von 6,8 % charakterisiert ist.

b) Das Umkristallisieren des Rohbilirubins.

Die Fraktionen I und II des Rohbilirubins bestehen aus fast reinem Farbstoff, jedoch sind keine deutlichen Kristalle sichtbar. Schöne Kristalle erhält man beim Umkristallisieren aus siedendem Dimethylanilin. Da diese Methode jedoch zu nicht unerheblichen Verlusten führt — E. Niethammer[2]) gewann im besten Fall 65 % reines Bilirubin — und die Entfernung des Dimethylanilins nur durch sehr lange Behandlung mit Alkohol[3]) möglich ist, so benutzte ich eine Beobachtung

[1]) cf. diese Dissertation, Abschnitt IX.

[2]) E. Niethammer, Dissertation Tübingen 1907, pag. 24 ff.

[3]) Gegen das Umkristallisieren aus siedendem Dimethylanilin führt H. Fischer an, daß es unmöglich sei, durch Waschen mit Alkohol den Farbstoff von anhängendem Dimethylanilin ganz zu befreien. Er erhielt bei dem aus Dimethylanilin umkristallisierten Farbstoff immer zu hohe Werte für Kohlenstoff; deshalb kristallisiert er sein Bilirubin nur aus Chloroform und reinigt es durch Aufnahme in Natronlauge und Fällen mit Säure.

von Orndorff und Teeple[1]), wonach das Bilirubin in einer Lösung von Chinin in Chloroform erheblich leichter löslich ist, als in reinem Chloroform, um das Bilirubin umzukristallisieren.

Das Verfahren gestaltet sich wie folgt:

1,0 g feinst gepulvertes, bei 110 ° getrocknetes Bilirubin wird in eine Lösung von 1,0 g Chinin in 100 g Chloroform eingetragen und im Schüttelapparat bis zur Lösung geschüttelt; in der Regel hat sich der Farbstoff in einer halben Stunde vollständig gelöst.

Die Lösung wird filtriert und in 250 ccm siedenden Eisessig eingetragen; das Ganze läßt man dann auf dem Wasserbade stehen, bis der Hauptteil des Chloroforms verdunstet ist.

Das Bilirubin kristallisiert nun in großen rhombischen Säulen aus, doch kommen auch langgestreckte Nadeln vor. Der Eisessig ist durch einen in Lösung gegangenen Farbstoff dunkelgrün gefärbt.

Das auskristallisierte Bilirubin wird abfiltriert und mit Alkohol bis zum Verschwinden der Thalleiochin-Reaktion gewaschen.

Aus 1,0 g Rohbilirubin erhielt ich durchschnittlich 0,7 g reines Bilirubin.

Das auf diese Weise umkristallisierte Produkt wurde analysiert:

I. 0,2972 g Substanz gaben 0,1672 g H_2O und 0,7311 g CO_2
= 6,26 % H und 67,09 % C.

0,0689 g Substanz lieferten 6,2 ccm N bei 720 mm
und + 11 ° C.
= 10,3 % N.

II. 0,1074 g Substanz gaben 0,0649 g H_2O und 0,2620 g CO_2
= 6,7 % H und 66,98 % C.

---

[1]) W. R. Orndorff u. J. E. Teeple. On Bilirubin, the red colouring matter of the bile. Americ. Chem. Journal Vol. 26, pag. 86.

0,0489 g Substanz lieferten 4,2 ccm N bei 738 mm + 9° C. = 9,9 % N.

Berechnet für $(C_{16} H_{18} O_3 N_2)x$	Gefunden I.	Gefunden II.
% C = 67,16	67,09	66,98
% H = 6,29	6,26	6,7
% O = 9,79	10,3	9,9

II.

Ueber die Salze des Bilirubins.

Der erste, der sich mit der Salzbildung des Bilirubins beschäftigte, war Thudichum[1]). Er stellte eine größere Anzahl Bilirubin-Metallverbindungen her und suchte aus ihrer Zusammensetzung auf die Molekulargröße des Bilirubins zu schließen. Er beschrieb ein Ammonium-, Kalium- und Natriumsalz, ohne jedoch Formeln für diese Verbindungen aufzustellen. Bei der Darstellung der Silber-, Baryum-, Kalzium-, Zink- und Bleisalze stellte er drei Reihen von Salzen auf: die halbsauren, die neutralen und basischen Salze. Die halbsauren Salze erhielt er beim Versetzen einer neutralen Lösung von Bilirubin in Ammoniak mit einem neutralen Metallsalz. Aus etwas alkalischen Lösungen erhielt er die neutralen Verbindungen der Erdalkalien; Zusatz von Blei- oder Silbersalz zu alkalischen Bilirubinlösungen lieferte die basischen Silber- und Bleisalze. Die von ihm analysierten Salze ergaben folgende Werte:

$C_9 H_{10} Ag NO_3$ = $C_9 H_8 Ag NO_2 + H_2O$ = neutrales, einfach gewässertes Bilirubin-Silber = 37,5 % Ag.

$C_9 H_7 Ag_2 NO_2$ basisches, wasserfreies Bilirubin-Silber = 57,3 % Ag.

$C_{18} H_{20} Ba N_2 O_6$ = $C_{18} H_{16} Ba N_2 O_4 + 2 H_2O$ = neutrales, gewässertes Bilirubin-Baryum. = 25,5 % Ba.

[1]) Journal für praktische Chemie 104, pag. 193.

$C_{27} H_{29} Ba N_3 O_8 = C_{27} H_{25} Ba N_3 O_6 + 2 H_2O$ = halbsaurs, gewässertes Bilirubin-Baryum = 20,7 % Ba.

$C_{18} H_{20} Ca N_2 O_6 = C_{18} H_{16} Ca N_2 O_4 + 2 H_2O$ = neutrales gewässertes Bilirubin-Kalzium = 10,0 % Ca.

$C_{27} H_{29} Ca N_3 O_8 = C_{27} H_{25} Ca N_3 O_6 + 2 H_2O$ = halbsaures, gewässertes Bilirubin-Kalzium = 7,1 % Ca.

$C_{27} H_{29} Zn N_3 O_8 = C_{27} H_{25} Zn N_3 O_6$ = halbsaures, gewässertes Zinksals = 11,0 % Zn.

$C_9 H_7 Pb NO_2$ = basisches, wasserfreies Bilirubin-Blei = 52,2 % Pb.

Das von Städeler hergestellte Kalziumsalz mit 9,1 % CaO = 6,5 % Ca, für das er die Formel $C_{32} H_{34} Ca O_6 N_4$ aufstellte, hielt Thudichum für das „halbsaure" der Zusammensetzung $C_{27} H_{29} Ca N_3 O_8$.

Später hat R. Köster[1]) ebenfalls zur Ermittelung der Molekulargröße des Bilirubins das Kalziumsalz hergestellt, indem er eine schwach ammoniakalische, verdünnte kalte Lösung von Bilirubin mit wässeriger Chlorkalziumlösung vorsichtig versetzte, bis ein bleibender Niederschlag entstand. Bei der Elementaranalyse erhielt er folgende Werte:

Berechnet für	Gefunden		
$(C_{16} H_{17} N_2 O_3)_2 Ca$	I.	II.	III.
C = 62,95 %	61,84	61,29	62,68
H = 5,57 %	5,79	5,82	5,76
C = 9,18 %	8,42	8,83	8,79
Ca= 6,56 %	6,89	6,77	6,62

Was nun die Frage betrifft, ob sich das Bilirubin aus seinen Salzen wieder gewinnen läßt, so finden sich bei Thudichum keine bestimmten Angaben. Beim Trocknen des Ammonsalzes bei 100° erhielt er, nachdem das Ammo-

[2]) Inaugural-Dissertation, Rostock 1901.

niak entwichen war, als Rückstand den Farbstoff als grünlich braune, glänzende, brüchige Masse. Beim Zersetzen des Bilirubinkaliums oder des -Natriums mit Säuren erhielt er den Farbstoff in grünlichen oder roten Flocken wieder. Aus einer Lösung von Bilirubin in alkoholischem Kaliumhydroxyd wird der Farbstoff durch Salzsäure in braunen Flocken wieder gefällt. Bei den übrigen Salzen machte er keinen Versuch, den Farbstoff aus seinen Salzen zu regenieren.

Köster (loc. citat.) scheint aus der Kalziumverbindung das Bilirubin wieder isoliert zu haben. Er schreibt: „Das Bilirubin-Kalzium ist durch stärkere Säuren leicht zerlegbar in Bilirubin und das Kalziumsalz der betreffenden Säure."

Ich stellte nun verschiedene Salze des Bilirubins her, suchte deren Zusammensetzung festzustellen und vor allem die Frage zu entscheiden, ob sich das Bilirubin aus seinen Metallsalzen wieder gewinnen läßt.

Kaliumsalz des Bilirubins.

Theoretisch wären für $C_{32}\,H_{34}\,K_2\,O_6\,N_4$ auf 1,00 g Bilirubin 34,9 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge nötig; es gelingt jedoch nicht, mit dieser Menge Alkali den Farbstoff in Lösung zu bringen, auch nicht bei 24stündigem Schütteln im Apparat. Es wurden nun 1,0041 g Bilirubin in 40 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge gelöst und die Lösung mit ausgekochtem, destilliertem Wasser auf 100 ccm verdünnt. Die schön rot gefärbte Lösung wurde im Wasserbade unter vermindertem Druck abgedampft. Es hinterblieben glänzende Lamellen von Bilirubin-Kalium. Dieselben lösten sich leicht in Wasser, Alkohol, Azeton, Methylalkohol, dagegen sehr schwer in Chloroform, Äther, Benzol, Schwefelkohlenstoff.

Analyse.

Wie vorauszusehen war, enthielt dieses Salz mehr Kalium, als sich nach der Formel $C_{32}\,H_{34}\,K_2\,O_6\,N_4$ berechnet.

0,3014 g des Salzes wurden in 100 ccm Wasser gelöst, 10 ccm $^1/_2$ N-Salzsäure hinzugefügt und der freigewordene Farbstoff mit Chloroform extrahiert, bis die grüne Farbe der

wässerigen Lösung nahezu verschwunden war. Die wässerige Lösung wurde unter Zusatz von Salzsäure abgedampft und das Kalium als Chlorkalium bestimmt.

Gefunden wurden 0,0773 g KCl = 13,4 % K.
Berechnet für $C_{32} H_{34} K_2 O_6 N_4$ = 12,03 % K.

Ich versuchte nun, das überschüssige Alkali durch Dialyse zu entfernen, Zu diesem Zwecke stellte ich genau dieselbe Bilirubin-Kaliumlösung, wie oben beschrieben, her. Ich löste also 1,0041 g Bilirubin in 40 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge und verdünnte die Lösung mit ausgekochtem Wasser auf 220 ccm. Diese Lösung wurde der Dialyse unterworfen.

Nach 24 Stunden: In das Außenwasser war etwas Farbstoff übergetreten. Derselbe wurde mit 10 ccm $^1/_{10}$ N-Salzsäure ausgefällt, wobei sich die Lösung grün färbte. Der Farbstoff wurde abfiltriert und gut ausgewaschen. Zum Zurücktitrieren waren 5,9 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge nötig. Es waren also 4,1 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge ausgetreten.

Nach 48 Stunden waren 1,4 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge ausgetreten.
„ 120 „ „ 1,7 „ $^1/_{10}$ „ „
„ 192 „ „ 0,9 „ $^1/_{10}$ „ „

Im ganzen waren 8,1 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge ausgetreten, also etwas mehr, als der Überschuß betrug, der zur Lösung des Bilirubins nötig war, aber nicht etwa die Hälfte der für ein Molekül Bilirubin berechneten Menge.

Entsprechend ergab die Analyse der Innenflüssigkeit, daß das restierende Salz noch 10 % Kalium enthielt, statt 6,3 % K für $C_{32} H_{35} K O_6 N_4$.[1])

Die nicht zur Kaliumbestimmung verwendete Hälfte der Innenflüssigkeit wurde mit Kohlendioxyd gesättigt, wobei sich ein grüner Farbstoff abschied. Danach wird nicht nur das Bilirubin, sondern auch das durch Oxydation mittels Luft-

[1]) Anm. Die Gesamtmenge betrug 220 ccm, zur Kaliumbestimmung wurde die Hälfte, also 110 ccm verwendet. Nach Ausfällung des Farbstoffes mit $\frac{n}{10}$ HCl und sorgfältigem Nachwaschen wurden aus den Filtraten 0,086 g KCl isoliert = 0,050 g K.

sauerstoffs in alkalischer Lösung entstehende Biliverdin durch Kohlensäure gefällt.

Das Filtrat war hellgrün gefärbt, bedingt durch Spuren in Lösung gebliebenen Farbstoffs.

Ich suchte nun nach einer anderen Methode das Kaliumsalz des Bilirubins zu erhalten.

Ich schüttelte 1,0 g Bilirubin mit 250 ccm Chloroform, filtrierte von dem ungelösten Farbstoff ab und destillierte von dem Filtrat das Lösungsmittel bis auf ca. 50 ccm ab. Diese konzentrierte Bilirubinlösung schüttelte ich mit 15 %iger Kalilauge aus. Es entstand ein voluminöser Niederschlag, der abgesaugt und auf einem Tonteller getrocknet wurde. Das erhaltene Salz löste sich leicht in Wasser und Alkohol, dagegen schwer in Chloroform. Die wässerige Lösung reagierte neutral.

Analyse.

0,6020 g Bilirubinkalium ergaben 0,1344 g K Cl
= 11,7 % K.

Dieses Salz dürfte demnach als reines Bilirubin-Kalium anzusehen sein.

Baryumsalz.

Eine Lösung von 1,0041 g Bilirubin in 40 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge + 60 ccm ausgekochten Wassers wurde mit 9 ccm einer Chlorbaryumlösung (55 : 1000) versetzt und der entstandene Niederschlag absitzen gelassen. Die über demselben stehende Flüssigkeit war braun gefärbt, gab jedoch mit Baryumchlorid keine Fällung mehr. Der Niederschlag wurde abfiltriert und bis zum Verschwinden der Ba''-Reaktion gewaschen. Das Filtrat war grün gefärbt, das entstandene Salz nach dem Trocknen metallglänzend.

Analyse.

0,0762 g Substanz lieferte beim Veraschen 0,0180 g Asche, die ihrerseits 0,0253 g $BaSO_4$ gab = 19,4 % Ba.

Berechnet für $C_{32}H_{34}BaO_6N_4$ = 19,3 % Ba.

Bemerkenswerter Weise läßt sich aus dem Baryumsalz schon durch molekulare Mengen von Chlorkalzium alles Baryum durch Kalzium verdrängen. Der Umsatz vollzieht sich also ganz glatt nach der Gleichung:

$$C_{32}\,H_{34}\,Ba\,O_6\,N_4 + CaCl_2\,6\,aq = C_{32}\,H_{34}\,Ca\,O_6\,N_4 + Ba\,Cl_2 + 6\,H_2\,O$$

obgleich sich die Salze nicht durch den Grad ihrer Löslichkeit unterscheiden.

Kalziumsalz.

1,0 g Bilirubin-Baryumsalz wurde mit 0,31 g Chlorkalzium in 100 ccm Wasser verteilt und längere Zeit im Schüttelapparat geschüttelt, dann abfiltriert und ausgewaschen. Im Filtrat war durch Zusatz von Gipswasser Baryum nachzuweisen. Der Niederschlag wurde gesammelt, getrocknet und auf Baryum untersucht, wobei sich zeigte, daß sämtliches Baryum durch Kalzium verdrängt worden war.

Analyse.

0,1278 g Substanz lieferte 0,0125 g CaO = 7,05 % Ca.
Berechnet für $C_{32}\,H_{34}\,Ca\,O_6\,N_4$ 6,58 % Ca.

Silbersalz.

2,0 g Bilirubin wurden mit 70 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge und 130 ccm Wasser geschüttelt; da nach einem Tag noch keine Lösung stattgefunden hatte, wurden noch 5 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge zugegeben, worauf aller Farbstoff in Lösung ging.

Ferner wurden 2,2 g Silbersulfat in 300 ccm siedendem Wasser gelöst und filtriert. Unter Umrühren wurde nun die Bilirubin-Lösung mit der auf Zimmertemperatur erkalteten Silberlösung versetzt. Der entstandene Niederschlag war zuerst rostfarben, färbte sich jedoch schnell dunkler bis schwarz. Unter Abschluß von Licht wurde bis zum Verschwinden der Silberreaktion gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Analyse.

0,1973 g Substanz ergaben 0,0718 g Ag = 36,0 % Ag
0,3015 g CO_2 und 0,0064 g H_2O
= 41,2 % C und 3,6 % H.

		% Ag	% C	% H
Berechnet für	$C_{32}H_{32}Ag_4O_6N_4$	44,2 Ag	39,3 C	3,2 H
	$C_{32}H_{33}Ag_3O_6N_4$	36,2 Ag	43,0 C	3,8 H
	$C_{32}H_{34}Ag_2O_6N_4$	27,4 Ag	48,9 C	4,3 H

Die Analyse ergab Werte, die am besten mit denen übereinstimmten, die sich aus der Formel $C_{32}H_{33}Ag_3O_6N_4$ berechnen. Es muß in Betracht gezogen werden, daß dem Niederschlag nach seiner Darstellung etwas Ag OH beigemengt war. Die obige Analyse stimmt auf ein Salz der Formel $(C_{32}H_{33}Ag_3O_6N_4 \cdot H_2O)_6$ Ag OH.

Für diese Formel berechnen sich	Gefunden
%	%
Ag = 36,7	Ag = 36,0
C = 41,2	C = 41,2
H = 3,7	H = 3,6

Das erhaltene Silbersalz war unlöslich in Wasser, gab jedoch auf Zusatz von Alkali eine anscheinend colloidale Lösung.

Ferner zeigte es sich, daß man zu Silbersalzen mit recht verschiedenem Metallgehalt kommt, je nach der Art des Bilirubins, während es gleichgültig war, ob vom Kalium- oder vom Natriumsalz ausgegangen war.

Ich stellte deshalb unter den verschiedensten Versuchsbedingungen Silbersalze des Bilirubins her.

a) Bilirubin, aus Dimethylanilin umkristallisiert, 4 Jahre alt. Es wurde unter Einhaltung der oben geschilderten Bedingungen gearbeitet.

Die Analyse ergab folgende Werte:

0,2195 g Substanz gab 0,0709 g Ag = 32,3 % Ag
0,0793 g H_2O und 0,3519 g CO_2
= 3,88 % H und 43,7 % C.

b) Es wurde ein Bilirubin verwandt, das nach W. Küster frisch aus Dimethylanilin umkristallisiert war. Die Analyse ergab:

0,1665 g Substanz 0,0640 g Ag = 38,3 % Ag
0,0600 g H_2O und 0,2614 g CO_2
= 4,00 % H und 42,8 % C.

c) Während bei den unter a und b beschriebenen Versuchen immer vom Kaliumsalz ausgegangen war, ging ich dieses Mal vom Bilirubin-Natrium aus, indem ich frisch aus Dimethylanilin umkristallisiertes Bilirubin in der berechneten Menge $^1/_{10}$ N-Natronlauge löste. Das erhaltene Silbersalz ergab folgende Werte:

0,2058 g Substanz ergab 0,080 g Ag = 38,9 % Ag
ferner 0,070 g H_2O und 0,3228 g CO_2
= 4,00 % H und 42,7 % C.

d) Es wurde ein Bilirubin verwandt, das aus Chinin-Chloroform frisch umkristallisiert war. Das Silbersalz lieferte bei der Elementaranalyse folgende Werte:

0,1685 g Substanz gab 0,0608 g Ag = 36,1 % Ag
0,2643 g CO_2 und 0,0561 g H_2O
= 42,8 % C 3,7 % H.

Dieses Salz stimmt gut auf die Formel $C_{32}H_{33}Ag_3O_6N_4$, für die sich 36,2 % Ag 43,0 % C, 3,8 % H berechnet.

e) Während bei den Versuchen a bis d immer in der Kälte gearbeitet wurde, fällte ich jetzt das Bilirubin-Kalium mit der Silbersulfatlösung in der Siedehitze.

Das gebildete Silbersalz zeigte zum Unterschied von dem bei Zimmertemperatur gefällten einen mehr grünen Farbenton.

Angewandt wurden 2,0 g Bilirubin, frisch aus Dimethylanilin umkristallisiert. Ausbeute 2,6 g.

Analyse.

0,1982 g Substanz 0,0815 g Ag = 41,00 % Ag
ferner 0,2830 g CO_2 und 0,060 g H_2O
= 39,5 % C 3,4 % H.

In dem Filtrat wurde der Kaliumgehalt bestimmt, um zu sehen, ob alles Kalium durch Silber verdrängt war. Das etwas grün gefärbte Filtrat wurde auf dem Wasserbade konzentriert und das Silber durch Salzsäure ausgefällt. Das Filtrat wurde zur Trockene verdampft und zur Zerstörung des mitgerissenen Farbstoffs schwach geglüht. Der Glührückstand wurde in Wasser aufgenommen, mit Schwefelsäure abgeraucht und geglüht.

Es hinterblieben 0,866 g K_2SO_4 = 0,388 g K.
Angewandt waren 70 ccm $\frac{n}{10}$ KOH = 0,392 K.

Es wurden also im Filtrat 98,9 % des angewandten Kaliums wiedergefunden. Da bei der beschriebenen Operation ein Verlust nicht zu vermeiden war, so kann wohl angenommen werden, daß sämtliches Kalium durch Silber verdrängt war, das Silbersalz also frei von Kalium war.

f) Ich stellte nun noch ein Silbersalz des Bilirubins her, indem ich von einem Kaliumsalz ausging, das durch Ausschütteln einer konzentrierten Bilirubin-Chloroformlösung mit 10 %iger Kalilauge erhalten war und einen Kaliumgehalt von 11,9 % hatte. Die wässrige Lösung des Kaliumsalzes reagierte auch neutral.

0,8 g Bilirubinkalium wurden in 100 ccm Wasser gelöst und diese filtrierte Lösung mit einer heiß bereiteten und wieder erkalteten Lösung von 0,9 g Silbersulfat in 150 ccm Wasser versetzt. Der entstandene Niederschlag schied sich rasch ab; die über demselben stehende Flüssigkeit war farblos; der Niederschlag wurde mit Wasser bis zum Aufhören der Schwefelsäure-Reaktion gewaschen und getrocknet. Ausbeute 1,1 g Silbersalz.

Das Salz gab beim Veraschen einen Silbergehalt von 40,8 % Ag, 41,2 % C und 3,5 % H.

Analyse.

0,2250 g Substanz 0,0920 g Ag = 40,8 % Ag
ferner 0,3402 g CO_2 und 0,0707 g H_2O
= 41,2 % C und 3,5 % H.

Wie aus diesen Versuchen ersichtlich, ist der Metallgehalt der Silbersalze sehr abhängig von den bei der Darstellung eingehaltenen Versuchsbedingungen. Je nachdem heiß oder kalt gefällt wird, oder ob altes, gelagertes Bilirubin oder frisch umkristallisiertes verwandt wird, fällt der Silbergehalt der erhaltenen Salze verschieden aus und der Metallgehalt der einzelnen Salze schwankt von 32—41 %, d. h. zwischen 2 und 4 Atomen Silber auf 1 Molekül Bilirubin.

Um zu untersuchen, wie fest in den beschriebenen Salzen das Metall an Bilirubin gebunden ist, wurde das Silbersalz mit Chlorbaryumlösung geschüttelt, dann wurde abfiltriert, ausgewaschen und das erhaltene Salz analysiert. In der Asche ließ sich nur Silber, dagegen kein Baryum nachweisen, ein Beweis, daß Baryum nicht imstande ist, Silber aus seiner Verbindung mit Bilirubin zu verdrängen.

Dagegen vermag dies teilweise das Kalzium. Beim Schütteln von Bilirubin-Silber mit Kalziumchlorid in wässriger Lösung läßt sich im Filtrat Silber nachweisen. Ebenso fand sich in der Asche des Salzes Kalzium.

0,3477 g Substanz ergaben beim Veraschen

0,0931 g Ag = 26,7 % Ag
0,0148 g CaO = 3,0 % Ca.

Da das angewandte Silbersalz der Zusammensetzung $C_{32}\ H_{33}\ Ag_3\ O_6\ N_4$ am nächsten kam, so ist ein halbes Atom Kalzium eingetreten auf ein Molekül Bilirubin.

Während sich also Baryum aus seiner Verbindung mit Bilirubin vollständig durch Kazlium verdrängen läßt, ist dies bei der Silberverbindung nur in geringem Maße möglich.

Zur Herstellung des Eisensalzes wurde die Lösung eines Moleküls Bilirubin durch eine Lösung von Ferroammonium-

sulfat gefällt. Obwohl nach den Erfahrungen beim Kalzium und Baryumsalz nur der Eintritt eines Atomes Fe erwartet werden konnte, wurde doch ein Ueberschuß von Ferroammoniumsulfatlösung angewandt, um Gelegenheit zur Bildung eines Salzes mit 2 Atomen Fe zu geben und zwar wurde auf 1,0 g Bilirubin 1,6 g Ferroammonsulfat angewandt; (berechnet sind 1,4 g = 2 Molekül.)

Das erhaltene Salz war in Wasser unlöslich, löste sich jedoch auf Zusatz von Ammoniak, Natronlauge, Natriumkarbonat. In Chloroform ist es nur sehr schwer löslich, in Alkohol und Aether unlöslich. Läßt man eine Lösung des Eisensalzes in Soda einige Zeit stehen, so wird das Eisen abgespalten.

Analyse

0,2229 g Substanz 0,1030 g H_2O und 0,4216 g CO_2 = 5,1 % H 59,8 % C.

Das Eisen wurde nach Auflösen des Schiffchenrückstandes in Salzsäure durch Fällen mit Ammoniak, Trocknen und Glühen des Rückstandes bestimmt. Es wurden erhalten 0,035 g Fe_2O_3 = 11,0 % Fe.

	Berechnet:	Gefunden:
für $C_{32}H_{34}FeO_6N_4$	%	%
	9,8 Fe	11,0 Fe
	5,4 H	5,1 H
	65,3 C	59,8 C

Auch diesem Salz dürfte $Fe(OH)_2$ oder FeO anhaften.

Zinksalz.

Es wurde unter genauer Einhaltung derselben Bedingungen, wie beim Baryum- und Kalziumsalz, gearbeitet. Es wurde auf 1 g Bilirubin 1,2 g kristallisiertes Zinksulfat angewandt.

Das Salz setzte sich gut ab, die überstehende Flüssigkeit war nahezu farblos. Es war unlöslich in Wasser, löste sich dagegen leicht auf Zusatz von Alkali, also jedenfalls

unter Zersetzung. Durch Salzsäure oder Essigsäure wird das Zink ebenfalls abgespalten.

Analyse.

0,2680 g Substanz gaben 0,0764 g H_2O und 0,4561 g CO_2
= 4,03 % H 59,2 % C
ferner 0,0385 g ZnO = 14,6 % Zn

Berechnet für $C_{32}H_{34}ZnO_6N_4$	Gefunden
%	%
5,35 H	4,03 H
60,4 C	50,2 C
10,2 Zn	14,6 Zn.

Ich versuchte nun, ein komplexes Zinksalz des Bilirubins herzustellen. Zu diesem Zwecke löste ich 1,0 g Bilirubin in 40 ccm alkoholischer $^1/_{10}$ N-Kalilauge. Diese filtrierte Lösung wurde mit einem großen Ueberschuß einer alkoholischen Zinkacetatlösung versetzt. Es schied sich ein Niederschlag ab, der abfiltriert und mit Alkokol bis zum Verschwinden der Zinkreaktion gewaschen wurde. Das erhaltene Zinksalz, 1,2 g, war in Alkohol und Chloroform vollständig unlöslich. Diese Beobachtung spricht allerdings gegen die Bildung eines komplexen Salzes, während man aus dem Zinkgehalt des erhaltenen Salzes auf eine komplexe Verbindung schließen könnte.

Analyse.

0,2680 g Substanz gaben 0,0795 g H_2O u. 0,4530 g CO_2
= 3,3 % u. 48,3 % C
ferner 0,0095 g ZnO = 29.7 % Zn.

berechnet für $C_{32}H_{30}Zn_3N_4$, für $C_{32}H_{28}Zn_4O_6N_4$	Gefunden
%	%
H = 3,9 3,3 H	3,3 H
C = 50,4 46,6 C	48,3 C
Zn = 25,6 31,5 Zn	29,7 Zn

Demnach sind beinahe 4 Atome Zink in das Molekül Bilirubin eingetreten; dieser hohe Metallgehalt scheint auf

die Möglichkeit, komplexe Verbindungen des Bilirubins herzustellen, hinzuweisen.

Magnesiumsalz.

Es wurde auch hier auf ein Molekül Bilirubin ein Ueberschuß von zwei Molekülen kristallisiertem Magnesiumsulfat verwandt; auf 1,0 g Bilirubin beträgt die berechnete Menge Magnesiumsulfat 0,8 g.

Das Salz schied sich nur langsam ab; das Filtrat war dunkel gefärbt; doch trat auch nach tagelangem Stehen auf Zusatz von Magnesiumsulfat kein weiterer Niederschlag ein. Bei längerem Stehen mit Essigsäure wird das Metall aus dem Salz vollständig abgespalten.

Analyse.

9,1735 g Substanz gaben 0,0950 g H_2O und 0,4181 g CO_2 = 6,08 % H und 64,4 % C
ferner 0,0249 g $Mg_2 P_3 O_7$ = 3,2 % Mg.

Berechnet für $C_{32} H_{34} Mg O_6 N_4$		Gefunden	
	%		%
H	= 5,8	H	= 6,08
C	= 64,6	C	= 64,4
Mg	= 4,2	Mg	= 3,2

Versuche, aus einem Salze des Bilirubins den Farbstoff zu regenerieren.

Zur Entscheidung der Frage, ob der beim Zersetzen eines Bilirubinsalzes erhaltene Farbstoff noch Bilirubin oder ein demselben nahestehender Gallenfarbstoff ist, löste ich 1,00 g aus Dimethylanilin umkristallisiertes Bilirubin in 40 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge, verdünnte die Lösung mit ausgekochtem Wasser auf 1000 ccm und schüttelte, nachdem durch Einleiten von Wasserstoff sämtliche Luft aus der Flasche entfernt worden war, bis zur Lösung. Dann wurde unter möglichstem Abschluß der atmosphärischen Luft filtriert. In das Filtrat

wurde Kohlensäure eingeleitet. Der Farbstoff fiel in braunen Flocken vom Aussehen des Bilirubins aus. Innerhalb 3 bis 5 Minuten nahm der unter der Lösung befindliche Farbstoff einen grünlichen Ton an, der sich allmählich vertiefte. Der abfiltrierte und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Farbstoff löste sich in Bikarbonat und in Alkohol.

Wenn ohne besonderen Abschluß von Luft gearbeitet wurde, schied sich beim Einleiten von Kohlendioxyd sofort ein grüner Farbstoff ab, der sich ebenfalls in Bikarbonat und Kohlenstoff löste.

Es wurde nun noch das Zinksalz mit verdünnter Essigsäure einen Tag unter häufigem Umschütteln stehen gelassen, sodann vom Niederschlag abfiltriert. Der Rückstand erwies sich als zinkfrei und löste sich, nachdem die Essigsäure vollständig entfernt worden war, in Natriumbikarbonat und in Alkohol mit grüner Farbe, dagegen nicht in Essigsäure.

Analyse.

0,0858 g Substanz gaben 0,0478 g H_2O und 0,2030 g CO_2 = 6,2 % H und 64,7 % C.

Diese Zahlen stimmen auf einen Körper, der sich vom Bilirubin durch ein Plus der Elemente des Wassers unterscheidet.

Berechnet für $C_{32} H_{38} O_7 N_4$	Gefunden
%	%
C = 65,5	64,7 C
H = 6,4	6,2 H

Dieser Gallenfarbstoff dürfte in nahem Zusammenhang zu dem von W. Küster bei der Biliverdinbildung angenommenen hypothetischen Zwischenprodukt stehen, der sich allerdings aus dem Bilirubin durch Anlagerung von zwei Molekülen Wasser bilden soll. Er formuliert die Bildung des Biliverdins aus Bilirubin durch Oxydation in alkalischer Lösung folgendermaßen:

$$C_{32} H_{36} O_6 N_4 + 2 H_2O = C_{32} H_{40} O_8 N_4$$
$$C_{32} H_{40} O_8 N_4 + 2 O = C_{32} H_{36} O_8 N_4 + 2 H_2O.$$

So ist es auch bei der Bildung der Salze nicht ausgeschlossen, daß unter Einwirkung des Alkalis zuerst die Anlagerung von einem Molekül Wasser an das Bilirubin stattfindet. Die dabei entstehende Verbindung $C_{32} H_{38} O_7 N_4$, ist beim Fällen mit Salzlösungen an die Metalle gebunden.

Demnach dürften sich die durch Fällen einer Bilirubinlösung mit Metallsalzen erhaltenen Verbindungen nicht vom Bilirubin, sondern von einem Gallenfarbstoff ableiten, der aus dem Bilirubin durch Anlagerung eines Moleküls Wasser entsteht.

III.

Ueber die Methylierung des Bilirubins.

E. Niethammer[1]) hat bei der Einwirkung von Salzsäure und Alkohol auf Bilirubin mit 0,4 % Ausbeute einen grünen Farbstoff erhalten, der in seinen Eigenschaften mit Biliverdin übereinstimmte und auch bei der Analyse auf Biliverdin stimmende Werte gab. Doch hat er aus Mangel an Material nur eine Analyse ausgeführt und es auch unterlassen, eine Aethoxyl-Bestimmung nach Zeisel vorzunehmen.

Ich versuchte nun, die Veresterung des Bilirubins mit Methylalkohol und Salzsäure durchzuführen.

Versuch I.

0,3 g Bilirubin wurden in einer Lösung von 10 ccm Chloroform und 0,3 g Chinin gelöst. Diese Lösung wurde in siedendem Methylalkohol, der bei Zimmertemperatur mit gasförmiger Salzsäure gesättigt war, gegossen und auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis das Chloroform verdampft war. Es schied sich ein Niederschlag ab, der mit Alkohol bis zur Entfernung des Chinins gewaschen wurde. Das Produkt schien bei starker Vergrößerung kristallinisch. Dasselbe löste sich in Chloroform mit grüner Farbe, ebenso in Azeton, war dagegen unlöslich in Alkohol und Aether. Ausbeute 0,25 g.

[1]) Dissertation, Tübingen 1907.

Methoxylbestimmung nach Zeisel.

0,2476 g Substanz ergaben 0,0753 g Ag J = 1,9 % CH_3

Berechnet für $C_{32}H_{34}(OH_3)_2O_6N_4$	Berechnet für $C_{32}H_{35}(OH_3)O_6N_4$
%	%
68,0 C	67,6 C
6,6 H	6,48 H
9,3 N	9,5 N
5,00 CH_3	2,46 CH_3

Demnach dürfte eine Mischung aus methyliertem Bilirubin und reinem Bilirubin vorliegen.

Versuch II.

0,42 g Bilirubin wurden durch Schütteln im Apparat in 200 ccm Chloroform gelöst, der Ueberschuß des Chloroforms bis auf 50 ccm abdestilliert und mit 50 ccm Methylalkohol, der mit Salzsäuregas bei Zimmertemperatur gesättigt war, auf dem Wasserbade gekocht, bis die braune Farbe der Lösung in grün umgeschlagen war. Alkohol und Salzsäure wurden durch Ausschütteln mit Wasser entfernt, die Chloroformlösung mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, das überschüssige Chloroform bis auf einen kleinen Teil abdestilliert und die konzentrierte Lösung in Petroläther gegossen und abfiltriert, wobei ein Niederschlag eintrat, der abfiltriert und mit Petroläther ausgewaschen wurde.

Ausbeute: 0,44 g grüner Farbstoff.

Analyse:

0,1200 g Substanz gaben 0,0989 g Ag J
= 5,25 % CH_3.

0,1770 g Substanz gaben 0,0855 g H_2O
= 5,4 % H.

0,3993 g CO_2 = 61,7 % C.

Die Chlorbestimmung nach Carius ergab kein Ag Cl.

Nach dieser Analyse scheint durch die Einwirkung der Salzsäure das Bilirubin eine Zersetzung erlitten zu haben. Ich wiederholte deshalb den Versuch II mit der Aenderung, daß nur 10 Tropfen 25 % ige Salzsäure angewandt wurden. Die Veresterung dauerte jetzt bedeutend länger, erst nach 3 Stunden hatte die Lösung eine rein grüne Farbe angenommen. Der wie angegeben isolierte Ester gab bei der Analyse folgende Werte:

0,2750 g Substanz ergaben 0,2190 g Ag J = 5,1 % CH_3
0,1615 g „ „ 0,0928 g H_2O 0,3997 g CO_2
= 6,4 % H 67,9 % C.

Demnach hat bei dieser Methode die Veresterung einen glatten Verlauf genommen.

Ich versuchte nun, den Farbstoff aus dem Ester zu regenerieren. Die Verseifung scheiterte meist an der Leichtzersetzlichkeit des Bilirubins. Verdünnte, wässerige Alkalien wirken in der Kälte anscheinend nicht, während in der Hitze auch der Farbstoff zersetzt wurde. Beim Schütteln des Esters mit 25 % iger Salzsäure entstand ein brauner Farbstoff, der ganz das Aussehen des Bilirubins hatte. Doch veränderte sich auch sehr schnell die braune Farbe, indem sie in grün überging.

Die Eigenschaft des Esters, sich sehr leicht in Chloroform zu lösen, benutzte ich zu einer Molekulargewichtsbestimmung, wozu der verbesserte Beckmannsche Apparat benutzt wurde.

K = 36

ccm Lösungsmittel	g Substanz	Siedepunktserhöhung	Molekulargewicht
19,0	0,4510	0,19°	225
20,5	0,4519	0,175°	339
21,5	0,4510	0,179°	330
23,9	0,4519	0,150°	339

Berechnet für $C_{34} H_{40} N_4 O_6 = 600$
für $C_{17} H_{20} N_2 O_3 = 300$

Demnach dürfte für den Ester nur die einfache Formel $C_{16} H_{17} (CH_3) O_3 N_2$ in Betracht kommen.

IV.

Ueber die Einwirkung gasförmiger Salzsäure auf Bilirubin.

2,0 g frisch aus Chinin-Chloroform umkristallisiertes Bilirubin wurde mit 500 ccm Chloroform 2 Stunden geschüttelt, vom Ungelösten abfiltriert und die Lösung durch Abdestillieren des Lösungsmittels bis auf ca. 60 ccm konzentriert. In diese Lösung wurde gasförmige Salzsäure eingeleitet. Schon nach 1 bis 2 Minuten schlug die Farbe der Lösung von braun in purpurrot um; nach längerem Einleiten nahm die purpurrote Lösung eine grüne Fluoreszenz an. Nachdem eine halbe Stunde eingeleitet war, wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und im Exsikkator neben Kalk getrocknet. Der Niederschlag betrug 0,15 g; er hatte ein prächtig kantharidenglänzendes Aussehen. In Wasser war er unlöslich; dagegen löste er sich in Chloroform, Benzol, Methyläthylketon; die Lösungen hatten eine rote Farbe mit grüner Fluoreszenz und erinnerten sehr an Eosin-Lösungen.

Analyse.

9,1205 g Substanz ergaben 0,0412 g Ag Cl = 8,4 % Cl.
Berechnet für $C_{32} H_{34} Cl_2 O_6 N_4$ Cl = 11,0 %

Beim Schütteln mit Wasser ließ sich das Chlor aus dem Farbstoff nicht abspalten; dagegen ließ sich in einer alkoholischen Lösung des Farbstoffs mittels alkoholischer Silbernitratlösung Chlor nachweisen, ebenso wurde durch Natronlauge ein Teil des Chlors abgespalten.

Aus der von dem Niederschlag abfiltrierten Lösung ließ sich durch Zusatz von Petroläther in einer Ausbeute von 1,8 g ein zweiter Farbstoff gewinnen, der jedoch nicht das schöne, kantharidenglänzende Aussehen des I. Produktes hatte.

Analyse.

0,1900 g Substanz gaben 0,1135 g Ag Cl = 14,7 % Cl

Dieser Farbstoff enthält das Chlor, wenigstens einen Teil desselben, in jonisiertem Zustande; eine wässrige Ausschüttelung desselben gab mit Silbernitratlösung einen Niederschlag von Chlorsilber. Durch Natronlauge läßt sich sämtliches Chlor aus dem Farbstoff abspalten. Die Lösungen desselben in Chloroform, Benzol, Alkohol zersetzen sich beim Erwärmen, wobei der rote Farbenton in gelb umschlägt. Durch die Einwirkung der Salzsäure scheint auch im Molekül des Bilirubins eine Atomverschiebung vor sich gegangen zu sein, denn weder durch Natriummonophosphat noch durch Natronlauge läßt sich Bilirubin aus dem Farbstoff wiedergewinnen.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß in einem der beiden Produkte ein salzsaures Salz des Bilirubins vorliegt.

V.

Ueber die Spaltung des Bilirubins durch Säuren.

1. Spaltung durch 25 %ige Salzsäure.

Versuch 1.

1 g Bilirubin wurde mit 25 ccm 25 %iger Salzsäure im Rohr 10 Stunden auf 110° erhitzt; alsdann ließ ich die Säure noch 8 Tage bei Zimmertemperatur einwirken. Das Bilirubin schien tiefgehend zersetzt, das Reaktionsprodukt hatte einen eigenartigen Geruch angenommen. Der ungelöste Rückstand wurde abfiltriert und säurefrei gewaschen; er betrug 0,31 g. Das stark saure Filtrat war dunkelrot gefärbt; es wurde mit Wasserdampf destilliert, wobei sich ein Niederschlag bildete.

A. Der Rückstand von der Wasserdampfdestillation wurde so lange mit Wasser abgedampft, bis alle freie Salzsäure verschwunden war. Dann wurde mit Baryumhydroxyd alkalisch gemacht und die alkalische Flüssigkeit samt dem entstandenen Niederschlag der Destillation mit Wasserdampf unterworfen. Das Destillat wurde in Salzsäure aufgefangen, mit Natron-

lauge versetzt und im Kjeldahl-Apparat das Ammoniak bestimmt, indem es mit $^1/_{10}$ N-Kalilauge zurücktitriert wurde. Das gebildete Ammoniak entsprach 13,4 ccm $^1/_{10}$ N-Salzsäure, was 13,4 ccm $^1/_{10}$ N-Ammoniak oder 0,01876 g Stickstoff entspricht, oder, da 1 g Bilirubin 0,0975 g enthält, 20 % des vorhandenen Stickstoffs. Durch konzentrierte Salzsäure wird also aus dem Bilirubin etwa der fünfte Teil des Gesamtstickstoffs als Ammoniak abgespalten.

Daß Ammoniak und keine andere Base vorlag, wurde dadurch nachgewiesen, daß das gebildete Ammoniak mit Salzsäure versetzt und abgedampft wurde. Der Rückstand von Chlorammonium wurde in Wasser gelöst und mit Platinchlorid gefällt.

Analyse.

0,2013 g Platindoppelsalz hinterließen beim Glühen 0,1022 g Pt = 43,7 % Pt.

Berechnet für $(NH_4)_2$ Pt Cl_6	Gefunden
44,15 %	43,7 %

Es war also nur Ammoniak übergegangen.

B. Das Destillat aus saurer Lösung wurde in der Hitze mit Baryumhydroxyd versetzt.

Ein Teil der alkalischen Lösung wurde mit Wasserdampf destilliert; im Destillat fand sich keine reduzierende Substanz.

Aus dem Rest der alkalischen Lösung wurde das überschüssige Baryum durch Kohlendioxyd ausgefällt, das Filtrat abgedampft, in heißem Wasser aufgenommen und mit Silbersulfatlösung versetzt. Der entstandene Niederschlag von $BaSO_4$ hatte sich nach drei Stunden dunkel gefärbt, enthielt also Silberformiat, das sich allmählich zersetzt hatte. Eine Probe des Filtrats gab auf Zusatz von Bleiacetat einen Niederschlag, was ebenfalls auf die Gegenwart von Ameisensäure hinzeigt.

Es war mir nun vor allem darum zu tun, nachzuweisen, ob neben Ameisensäure auch Essigsäure aus dem Bilirubin durch Säuren abgespalten wird. Es ließ sich jedoch in dem

Rest des Filtrats vom Baryumsulfat keine Essigsäure nachweisen. Die Bestimmung von Ameisensäure neben Essigsäure wurde nach folgenden Methoden ausgeführt:

a) nach Fenton-Sisson (Centralblatt 1908 I pag. 1379), indem die Ameisensäure in der Kälte durch metallisches Magnesium zu Formaldehyd reduziert wurde, wobei die Essigsäure nicht angegriffen wird. Da sich jedoch in einer Kontrollbestimmung eines Gemisches von Ameisensäure und Essigsäure diese Methode als nicht zuverlässig erwiesen hatte, wurde die Abwesenheit von Essigsäure noch dadurch nachgewiesen, daß

b) die Ameisensäure durch Quecksilberchlorid oxydiert wurde, wobei das Quecksilberchlorid zu unlöslichem Calomel reduziert wurde. In dem Filtrat konnte ebenfalls keine Essig- nachgewiesen werden.

2. Spaltung durch 25 % ige Schwefelsäure.

Um festzustellen, ob die beschriebene Spaltung des Bilirubins durch Salzsäure eine spezifische Eigenschaft der Salzsäure oder eine allgemeine Wirkung von Säuren auf Bilirubin ist, wurde in gleicher Weise die Zersetzung des Bilirubins durch 25 % ige Schwefelsäure vorgenommen.

In Arbeit genommen wurde 1 g Bilirubin + 25 ccm 25 % ige Schwefelsäure. Um den Verlauf der Reaktion verfolgen zu können, wurde das Rohr zuerst 8 Stunden in einer gesättigten Chlornatrium-Lösung erhitzt. Das Bilirubin schien jedoch nur wenig angegriffen. Es wurde deshalb weitere 10 Stunden im Ofen auf 120 ° und dann noch 6 Stunden auf 130 ° erhitzt. Jetzt erst schien der Farbstoff vollständig zersetzt. Von den ungelösten Partikeln wurde abfiltriert; der Rückstand betrug, schwefelsäurefrei gewaschen und mit Chloroform extrahiert, 0,4 g. Das Filtrat wurde mit Wasserdampf destilliert.

A. Das Destillat reagierte schwach sauer (Schwefelsäure war nicht mit übergerissen worden); es wurde mit

Baryumhydrxyd alkalisch gemacht und das überschüssige Baryum durch Kohlensäure entfernt; das Filtrat wurde zur Trockene verdampft; der Rückstand erwies sich als ameisensaures Baryum, Essigsäure ließ sich nicht nachweisen. Zur Reinigung wurde der Rückstand im Wasser aufgenommen, filtriert und zur Trockene verdampft.

Analyse.

0,1032 g Substanz gaben 0,1065 g BaSO = 60,7 % Ba.

Berechnet für		Gefunden
$(HCOO)_2$ Ba	$(CH_3 COO)_2$ Ba	Ba = 60,7 %
Ba = 64,4 %	53,7 % Ba.	

B. Der Rückstand wurde mit Baryumhydroxyd alkalisch gemacht und nochmals mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat wurde in Salzsäure aufgefangen und das Ammoniak wie bei der Kjeldahl-Bestimmung bestimmt, indem 20 ccm $^1/_{10}$ N-Salzsäure vorgelegt wurden. Zum Zurücktitrieren der überschüssigen Säure waren 15 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge nötig; zur Bindung des gebildeten Ammoniaks waren also 5 ccm $^1/_{10}$ N-Salzsäure verbraucht worden. Demnach waren 5 ccm $^1/_{10}$ N-Ammoniak oder 0,007 g Stickstoff abgespalten worden. Da 1 g Bilirubin 0,097 g Stickstoff enthält, war ungefähr $^1/_7$ des Gesamtstickstoffes als Ammoniak abgespalten worden.

Der bei der Destillation bleibende Rückstand wurde durch Kohlensäure von überschüssigem Baryum befreit, abfiltriert und auf dem Wasserbade stark konzentriert. Die konzentrierte Lösung des Baryumsalzes wurde in Alkohol gegossen und einige Zeit stehen gelassen. Es schied sich ein Baryumsalz ab, dessen Menge jedoch zur Analyse nicht ausreichte.

Da wegen der von mir ausgeführten Acetylierungsversuche hauptsächlich darauf zu achten war, ob neben Ameisensäure aus Bilirubin auch Essigsäure abgespalten wird, untersuchte ich nach demselben Gange, wie bei den beschriebenen Versuchen, den bei der Umscheidung von Bilirubin, gelöst

in Chinin-Chloroform, aus Eisessig erhaltenen grünen Farbstoff, der in den Eisessig übergegangen war.

1,0 g des essigsäurefrei gewaschenen Farbstoffs wurde im Rohr mit 25 ccm 25 %iger Salzsäure auf 130° 6 Stunden lang erhitzt. Der Farbstoff schien stark zersetzt, er hatte eine braune Farbe angenommen.

Es wurde von dem Ungelösten abfiltriert, das Filtrat mit Wasserdampf destilliert; das Destillat mit Baryumhydroxyd versetzt, in der Hitze CO_2 eingeleitet, abfiltriert und abgedampft. Der Rückstand reduzierte stark ammoniakalische Silberlösung.

Dagegen gab weder die Kakodyl- noch die Eisenchloridreaktion ein positives Resultat auf Essigsäure. Es kann demnach als sicher angesehen werden, daß bei der Spaltung des Bilirubins durch Säuren, außer Ammoniak, nur Ameisensäure abgespalten wird. Die Spaltung verläuft glatter bei der Anwendung von Salzsäure als von Schwefelsäure.

VI.

Ueber die Einwirkung von Alkali auf Bilirubin.

I. Einwirkung wässriger Kalilauge auf Bilirubin.

2,0 g β-Bilirubin wurden in überschüssiger Kalilauge gelöst, einige Zeit gekocht am Rückflußkühler und dann destilliert.

a. Destillat reagierte alkalisch und wirkte reduzierend. Zur Bindung des abgespaltenen Ammoniaks wurde es mit Schwefelsäure sauer gemacht und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Das Destillat reduzierte ebenfalls ammoniakalische Silberlösung. Da die Vermutung nahelag, daß ein Aldehyd vorliege, wurde das Destillat mit einem Tropfen Phenylhydrazin in schwach essigsaurer Lösung eine Stunde auf dem Wasserbade erhitzt, wobei sich die farblose Flüssigkeit gelb färbte. Die gelbe Flüssigkeit wurde mit Petroläther ausgeschüttelt und das Lösungsmittel in einer Wasser-

stoffatmosphäre abdestilliert. Es hinterblieben undeutliche Kristallbildungen, die jedoch zu weiterer Untersuchung nicht ausreichten.

b. Der Destillationsrückstand wurde mit Schwefelsäure sauer gemacht und von dem ausgefallenen Farbstoff abfiltriert. Beim Ansäuren machte sich ein eigenartig aromatischer Geruch bemerkbar. Beim Ausschütteln mit Aether ging dieser Geruch in den Aether über; die ätherische Lösung reduzierte stark ammoniakalische Silberlösung.

Zur Bindung etwa übergangener Ameisensäure wurde die ätherische Lösung mit 5%igem Ammoniak ausgeschüttelt. Nach dreimaligem Ausschütteln reduzierte die ätherische Lösung ammoniakalische Silberlösung nicht mehr. Es kann also wohl mit Bestimmtheit behauptet werden, daß ein Aldehyd vorliegt.

Die Bisulfit-Doppelverbindung wurde durch Baryumhydroxyd zersetzt und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Die reduzierende Substanz ging mit den Wasserdämpfen über, denn das Destillat reduzierte stark sowohl ammoniakalische Silberlösung als auch Nesslers Reagens.

Die mit 5%igem Ammoniak ausgeschüttelte, ätherische Lösung wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Aether nochmals ausgeschüttelt. Nach Abdunsten des Aethers im Vakuum hinterblieben geringe Mengen eines braunen Sirups, der den charakteristischen Geruch nach bialkylierten Maleinsäuren zeigte. Ich versuchte nun das Baryumsalz der betreffenden Maleinsäure herzustellen. Der braune Rückstand wurde deshalb in Wasser aufgenommen und mit frisch gefälltem Baryumkarbonat geschüttelt. Das neutral reagierende Filtrat wurde erhitzt; es schied sich jedoch kein Baryumsalz aus, sondern erst bei starkem Eindampfen. Die Baryumsalze der bialkalisierten Maleinsäuren zeichnen sich dadurch aus, daß sie sich in kaltem Wasser leichter lösen als in heißem. Zu genauerer Untersuchung reichte das Material nicht aus.

In dem Auftreten eines Aldehyds bei der Aufspaltung durch Alkali erinnert das Bilirubin sehr an den Indigo. Dieser liefert, wie Friedländer nachweisen konnte, bei der Spaltung durch Alkali eine Säure, die Anthranilsäure, und einen Aldehyd, den α-Aldehyd des β-Oxyindols. Der Anthranilsäure des Indigos entspricht die Hämatinsäure des Bilirubins. Dem α-Aldehyd des β-Oxyindols beim Indigo entspricht bei der Aufspaltung des Bilirubins das Auftreten des oben angedeuteten Aldehyds; aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich um einen Aldehyd des Pyrrols, der voraussichtlich ein recht unbeständiger Körper sein wird.

II. Ueber die Einwirkung von schmelzendem Kaliumhydroxyd auf Bilirubin.

Nachdem W. Küster den Nachweis erbracht hatte, daß Hämatin und Bilirubin in einem Teil ihres Moleküls eine ähnliche Zusammensetzung aufweisen, dadurch, daß aus beiden Farbstoffen bei der Oxydation die Hämatinsäuren, allerdings in ungleichen Mengen, entstanden, und nachdem für das zweite Spaltungsstück des Hämatins, das Nencki'sche Hämopyrrol, erwiesen war, daß es aus einem anderen Teil des Hämatinmoleküls hervorgeht wie die Hämatinsäuren oder daß, wie W. Küster annimmt, aus dem Hämatin bis zu 4 Moleküle Hämatinsäure, aber nur bis zu zwei Molekülen Hämopyrrol entstehen können, lag es nahe zu versuchen, ob sich Hämopyrrol auch aus dem Bilirubin werde darstellen lassen. In der Tat ist denn auch von verschiedenen Forschern versucht worden, Hämopyrrol nach der Methode von Nencki aus dem Bilirubin zu gewinnen, so von Orndorff und Teeple[1]), neuerdings von H. Fischer[2]). Jene erhielten einen mit Wasserdampf flüchtigen Körper, der sich nach Geruch und der Fichtenspahnreaktion als ein Pyrrolderivat erwies und

[1]) Orndorff und Teeple, Americ. Chem. Journal Vol. 26, pag. 86, Vol. 33, pag. 215.

[2]) H. Fischer, Zeitschrift für physiol. Chemie 73, pag. 225.

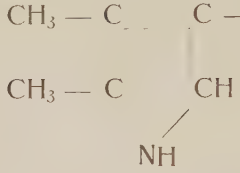
auch durch Quecksilber gefällt wurde. Dieser Niederschlag war aber nicht einheitlich; auf eine Analyse mußten sie verzichten wegen der geringen Menge; sie konnten so den sicheren Nachweis von der Bildung des Hämopyrrols nicht als geliefert erachten.

M. Fischer hat ebenfalls einen pyrrolartigen Körper erhalten, der mit Quecksilberchlorid gefällt wurde, glaubt aber diesem Befund überhaupt eine Beweiskraft absprechen zu sollen. Das für Hämopyrrol charakteristische pikrinsaure Salz darzustellen, gelang ihm nicht. Versuche im hiesigen Laboratorium, von W. Küster und seinen Mitarbeitern durchgeführt, sind ebenfalls ohne sicheres Ergebnis gewesen, daher nicht veröffentlicht worden.

Nun machte Piloty[1]) die bemerkenswerte Beobachtung, wonach Hämatoporphyrin bei der Behandlung mit schmelzendem Kali Pyrrolderivate gab, und zwar ein α-β-Dimethylpyrrol und Hämopyrrol. Es war zu erwarten, daß auch das Bilirubin unter gleichen Bedingungen eine analoge Aufspaltung erleiden würde. Wir haben daher den Versuch durchgeführt mit dem Ergebnis, daß in der Tat ein dem Hämopyrrol ähnlicher Körper gebildet wird, und zwar in nicht schlechter Ausbeute; sie betrug etwa 11 % des verwendeten Bilirubins. Leider konnten wir nicht genügende Mengen des kostbaren Farbstoffs verwenden, um eine Fraktionierung des erhaltenen Pyrrols durchzuführen, und sahen uns vorläufig darauf beschränkt, die Quecksilberchlorid-Quecksilberdoppelverdindung zu analysieren, da es nicht möglich war, ein kristallisiertes Pikrat zu erhalten. Die für das Quecksilber und das Chlor ermittelten Werte deuten darauf hin, daß wir es mit einem Pyrrol der Formel $C_8 H_{13} N$ zu tun haben, welche Formel dem Hämopyrrol und dem Phonopyrrol Pilotys ebenfalls zukommt. Da das erstere nach Piloty ein schön kristallisiertes Pikrat gibt, das letztere nicht, so wäre es

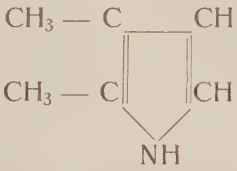
[1]) Berichte 42 III, 3260 und 4693.

nicht unmöglich, daß sich in unserem Falle Phonopyrrol



4,5 Dimethyl-3-aethylpyrrol gebildet hätte. Nach Knorr gibt aber gerade das synthetisch gewonnene 2,4 Dimethyl-3-aethylpyrrol (Pilotys Hämopyrrol) mit Pikrinsäure keine kristallisierte Verbindung.

Endlich muß zugestanden werden, daß ein Gehalt an α-β-Dimethylpyrrol,



der bei der Zerlegung des Hämatophorphyrins wie der Hämatopyrrolidinsäure durch schmelzendes Kali von Piloty beobachtet wurde, in unserem Rohprodukt nicht ausgeschlossen ist.

Unsere Versuche zeigen also nur, daß auch bei dieser bemerkenswerten Zersetzung die Derivate des Hämatins einerseits, das Bilirubin andererseits ein durchaus ähnliches Verhalten zeigen.

Wir nahmen die Spaltung in dem von Piloty[1]) beschriebenen Apparat vor. Als Kühler erwies sich ein Glasrohr von 1 m Länge und 1 cm lichter Weite als praktisch.

20,0 g Bilirubin-Abfälle trugen wir in 200 g auf 120° erhitztes Aetzkali, das mit 30 ccm Wasser versetzt war, ein. Bei ca. 250° begann eine wässerige Flüssigkeit überzudestillieren, die stark nach Ammoniak roch und alkalisch reagierte.

---

[1]) Berichte 42 III 3260 und 4693.

Bei ca. 290° begannen Tropfen eines farblosen Oeles mit der wässrigen Flüssigkeit überzugehen; wir erhitzten jedoch noch weiter bis 340°.

Das Destillat wurde in 20 %iger Essigsäure aufgefangen. Um die letzten Reste des Oeles mit überzureißen, wurde in das Schmelzgefäß durch einen darauf befestigten Tropftrichter 10 bis 20 ccm Wasser gelassen.

Das essigsaure Destillat wurde filtriert und mit Quecksilberchloridlösung versetzt. Es schied sich ein schwach rosa gefärbter Niederschlag aus, der unter Abschluß von Luft abfiltriert und im Vakuum vor Licht geschützt über Schwefelsäure getrocknet wurde.

Bei weiteren Versuchen mit reinem Bilirubin erhielten wir aus je 5,0 g Farbstoff

3,6 g 3,0 g 3,8 g Quecksilberdoppelsalz der Formel $(C_8 H_{12} N)_2 Hg (Hg Cl_2)_4$

durchschnittlich 3,5 g, was 0,55 g $C_8 H_{13} N$ oder 11 % der angewandten Menge Bilirubin entspricht.

Analyse des Quecksilberchlorid-Quecksilberdoppelsalzes.

0,1775 g Substanz gaben 0,1326 g AgCl = 18,64 % Cl. Zur Bestimmung des Quecksilbergehaltes wurde das Salz in Alkohol gelöst unter Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Salzsäure und unter starker Kühlung Schwefelwasserstoff eingeleitet.

0,1625 g Substanz ergaben 0,1237 g HgS = 65,5 % Hg.

Berechnet für $(C_8 H_{12} N)_2 Hg (Hg Cl_2)_4$	Gefunden
18,48 % Cl	18,68 % Cl
65,0 % Hg	65,6 % Hg

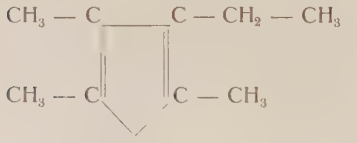
Versuch, aus dem Quecksilberchlorid-Quecksilber-Doppelsalz das Pyrrol zu isolieren.

7,0 g Schlamm des Doppelsalzes, entsprechend 3,6 g trockenen Salzes, wurden in Wasser suspendiert und mit

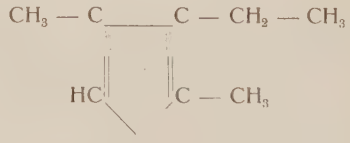
10 %iger Kalilauge, die mit Schwefelwasserstoff gesättigt war, versetzt. Es schied sich schwarzes Schwefelquecksilber aus, während die Flüssigkeit einen eigenartig unangenehmen Geruch, ähnlich dem des Hämopyrrols, annahm. Unter möglichstem Abschluß von Luft wurde sechsmal ausgeäthert, der Aether mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet und im Wasserstoffstrom bei möglichst niederer Temperatur abgedunstet. Es hinterblieben 0,5 g eines Oeles, das sich an der Luft rasch rot färbte.

Einige Tropfen des Oeles, in 20 %iger Essigsäure gelöst, gaben mit Quecksilberchlorid einen rötlich-weißen Niederschlag. Aus der ätherischen Lösung fielen, auch bei starkem Abkühlen, auf Zusatz von Pikrinsäure, in wässrigem Aether gelöst, keine Kristalle aus. Die mit Pikrinsäure versetzte Flüssigkeit färbte sich nur etwas dunkler bei längerem Stehen.[1])

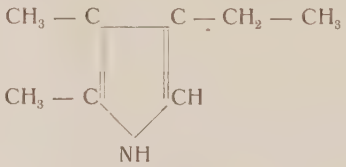
[1]) Anmerkung. Nach Abschluß obiger Versuche erschien die schöne Arbeit Willstätters über die Natur der aus Hämin und Chlorophyll durch Reduktion erhaltenen Pyrrole (Annalen 385, 188). Er wies nach, daß das Pyrrolgemisch aus drei Komponenten besteht, dem Hämopyrrol, iso-Hämopyrrol und dem Phyllopyrrol, denen folgende Konstruktion zukommt:



Phyllopyrrol.



Hämopyrrol.



iso-Hämopyrroll.

Alle drei bilden kristallisierende Pikrate und können durch fraktionierende Salzbildung getrennt werden. Phyllopyrrol gibt keine Fichten-

VII.

Ueber Versuche, betreffend Acetylierung und Benzoylierung des Bilirubins.

Die Versuche, das Bilirubin zu acetylieren oder zu benzoylieren, verliefen erfolglos, woraus der Schluß zu ziehen ist, daß im Molekül des Farbstoffes eine Hydroxylgruppe schwerlich vorhanden sein dürfte.

I. Acetylierung.

1. 1 g Bilirubin wurde mit 100 ccm Essigsäureanhydrid übergossen und nach Zusatz von 5,0 g geschmolzenem Natriumacetat am Rückflußkühlerz wei Stunden erhitzt. Da nach dieser Zeit noch unverändertes Bilirubin sichtbar war, wurden nochmals 100 ccm Essigsäureanhydrid hinzugegeben und weiter erhitzt. Als nach weiteren drei Stunden völlige Lösung eingetreten zu sein schien, wurde die schmutzig-grüne Lösung durch ein Kreppfilter filtriert und das überschüssige Lösungsmittel unter vermindertem Druck bis auf ca. 30 ccm abdestilliert. Dieser Rückstand wurde in Wasser gegossen, vom entstandenen Niederschlag abfiltriert, und dieser zuerst längere Zeit mit Wasser gewaschen. Da die letzten Spuren Anhydrid nur schwer verschwanden, wurde, als eine Probe des Niederschlages sich sowohl in verdünnter Sodalösung als auch in verdünnter Natronlauge unlöslich zeigte, mit solchen Lösungen ausgewaschen. Dabei trat dann plötzlich, wohl als der Zweck gerade erreicht war, kolloide Lösung ein, die aber durch Zusatz von ein wenig Salzsäure wieder getrennt werden konnte.

Die Ausbeute betrug 0,98 g dunkelgrüner Farbstoff.

Um nachzuweisen, ob wirklich Acetylgruppen in das Bilirubin eingetreten waren, wurde versucht, den Acetylrest

---

spahnreaktion und wird auch durch $HgCl_2$ nicht gefällt. Es liegt nun nahe, daß auch in dem von mir aus Bilirubin erhaltenen Pyrrol ein solches Gemisch vorliegt. Leider stand mir nicht so viel Material zur Verfügung, um die Fraktionierung durchzuführen.

aus dem erhaltenen Produkt wieder abzuspalten, zu welchem Zwecke 0,314 g der Substanz mit 25 ccm 25 %iger Salzsäure im Rohr sechs Stunden auf 120° erhitzt wurden. Die Substanz schien stark zersetzt; sie hatte eine schmutzig-graue Farbe angenommen, war jedoch nicht vollständig in Lösung gegangen. Es wurde von den unlöslichen Partikeln abfiltriert und das Filtrat mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat wurde mit Baryumhydroxyd alkalisch gemacht, das überschüssige Baryum in der Hitze durch Kohlendioxyd entfernt, vom ausgeschiedenen Baryumkarbonat abfiltriert und das Filtrat abgedampft. Der Rückstand betrug 0,31 g, enthielt jedoch anscheinend noch Baryumkarbonat, daß sich beim Abdampfen durch Kohlensäure der Luft gebildet hatte, und Baryumchlorid, das durch Spuren von Salzsäure, die bei der Wasserdampfdestillation mit übergerissen worden waren, entstanden war. Mit diesem Rückstand wurden die Reaktionen auf Essigsäure vorgenommen. Sowohl die Kakodyl-Reaktion wie die Eisenchlorid-Reaktion verliefen jedoch negativ.

Der Rückstand reduzierte stark ammoniakalische Silberlösung; er wurde mit Wasser ausgezogen und die Lösung mit Bleiacetat versetzt. Es entstand ein Niederschlag, wohl von ameisensaurem Blei, das aus dem Farbstoff, wie beim Bilirubin, durch das Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure entstanden war, das mit Bleichlorid vermengt war.

2. Nachdem dieser Acetylierungsversuch negativ verlaufen war, versuchte ich durch Eingießen des mit Essigsäureanhydrid gekochten Bilirubins in Aceton, statt in Wasser wie beim vorigen Versuch, das eventuell acetylierte Produkt zu erhalten.

Es wurden dann 3,0 g Bilirubin mit 100 g Essigsäureanhydrid vier Stunden am Rückflußkühler auf dem Babo erhitzt, dann abfiltriert. Es hinterblieben 1,4 g ungelösten Bilirubins, die jedoch beim weiteren Kochen mit Essigsäureanhydrid noch in Lösung gingen. Das überschüssige Lösungsmittel wurde bis auf 50 ccm unter vermindertem Druck ab-

destilliert und der Destillationsrückstand in 300 ccm Aceton gegossen. Hierbei entstand eine Lösung, aus der sich bei längerem Stehen ein Niederschlag abschied, der nun filtriert und mit Aceton bis zum Verschwinden der saueren Reaction gewaschen wurde. Das Filtrat wurde durch Abdestillieren des Acetons stark konzentriert und durch weiteres Eingießen in Aceton noch weitere Mengen des eventuell acetylierten Produktes erhalten; doch war die Gesamtausbeute gering, sie betrug 1,3 g. Dieses Produkt wurde ebenfalls im Rohr mit 25 %iger Salzsäure sechs Stunden auf 120° erhitzt. Das Filtrat wurde wie oben behandelt, doch gelang es auch hier nicht, Essigsäure nachzuweisen.

II. Benzoylierung.

1. 1 g Bilirubin wurde mit 10 ccm $\frac{n}{2}$ Kalilauge und 40 ccm Wasser übergossen und filtriert. Nach Zusatz von 30 ccm Benzoylchlorid wurde jetzt eine halbe Stunde geschüttelt, wobei sich unter Erwärmen eine braune Masse ausschied, die zuerst schmierig-flüssig war, aber nach längerem Schütteln fest wurde. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen mit heißem Alkohol und Aether blieb jedoch reines Bilirubin zurück, das durch Auflösen in Chinin-Chloroform und Ausfällen aus siedendem Eisessig identifiziert wurde.

2. Es kamen dieselben Mengen Farbstoff und Benzoylchlorid zur Anwendung; im Gegensatz zum ersten Versuch wurde hier in stark alkalischer Lösung gearbeitet, indem 20 ccm 20 %ige Kalilauge zugefügt wurden. Die Masse erhitzte sich stark und es schied sich eine dunkle, grünliche Masse aus, die mit heißem Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen wurde. Die Waschflüssigkeiten waren stark grün gefärbt; auch hier blieb reines Bilirubin zurück, das aus seiner Lösung in Chinin-Chloroform durch Eintragen in Eisessig wieder erhalten wurde.

Auch das Waschwasser wurde noch daraufhin untersucht, ob es benzoylierten Farbstoff enthielt. Es wurde bis zur

Hälfte abgedampft und der Rückstand in Wasser gegossen. Nachdem die mit ausgefallene Benzoesäure durch Aether entfernt war, hinterblieb noch 0,074 g Rückstand. Derselbe wurde mit 25 ccm 25 %iger Salzsäure in der Röhre vier Stunden auf 110° erhitzt. Der Röhreninhalt wurde filtriert und das Filtrat mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat wurde mit Baryumhydroxyd versetzt, in der Hitze Kohlendioxyd eingeleitet, abfiltriert und das Filtrat zur Trockene verdampft, mit Wasser aufgenommen, das Baryum durch Schwefelsäure ausgefällt und Niederschlag samt Filtrat ausgeäthert. Nach Abdunsten des Aethers konnte keine Benzoesäure nachgewiesen werden.

3. 1,0 g Bilirubin wurde in 50 g Benzoylchlorid in der Siedehitze gelöst, die Lösung durch ein Kreppfilter filtriert das Benzoylchlorid bis auf ca. 15 ccm unter vermindertem Druck abdestilliert und die konzentrierte Lösung in 1 Liter Wasser gegossen. Die anfangs schmierige Masse wurde bald fest und konnte filtriert und mit heißem Wasser ausgewaschen werden. Da das Produkt aber immer noch große Mengen Benzoesäure enthielt, wurde es durch tagelanges Extrahieren mit Petroläther im Apparat behandelt. Das erhaltene, grauschwarze Produkt war äußerst hygroskopisch. Dasselbe war in Natronlauge löslich, ebenso in Nitrobenzol, dagegen unlöslich in Chloroform, Methylalkohol, Schwefelkohlenstoff, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, wenig löslich in Eisessig, Dimethylanilin, Ammoniak.

Zwecks Nachweis von Benzoesäure wurde es wie bei Versuch 2 mit 25 %iger Salzsäure im Rohr erhitzt, das Filtrat mit Wasserdampf destilliert. Es konnte jedoch ebenfalls keine Benzoesäure nachgewiesen werden. Ich suchte nun durch Elementaranalyse Aufschluß über den erhaltenen Körper zu erhalten, erhielt jedoch bei den einzelnen Verbrennungen sehr von einander abweichende Werte, die darauf schließen lassen, daß wir es gar nicht mit einem chemischen Individuum zu tun haben.

Für Kohlenstoff erhielt ich Werte, die zwischen 65 % und 67 % schwanken, die Werte für Wasserstoff lagen zwischen 3,7 % und 4,9 %.

Bei Eintritt von Benzoylgruppen hätte ich erhalten müssen:

71,8 % C 5,8 % H 7,4 % N.

VIII.

Ueber die Oxydation des Bilirubins durch Chromsäure.

E. Niethammer[1]) hat bei der Oxydation des Bilirubins in essigsaurer Lösung bei Weiterverarbeitung der Rückstände bis 40 % ätherlösliche Säuren erhalten. Dieselben bestanden der Hauptsache nach aus Hämatinsäureanhydrid $C_8 H_8 O_5$, ferner aus Bernsteinsäure und aus einer in Aether schwer löslichen Säure, die bei der Reinigung in $C_8 H_8 O_5$ und Bernsteinsäure zerfällt; außerdem konnte er ein Auftreten von Kohlendioxyd und Abspaltung von Ammoniak beobachten.

Willstätter hat die Oxydation des Chlorophylls durchgeführt und als Oxydationsprodukte hauptsächlich das Imid der Hämatinsäure und Methyläthylmaleinimid, neben Essigsäure und Kohlensäure erhalten. Zum Unterschied von Niethammer ließ er die Chromsäure bei niederer Temperatur in stark schwefelsaurer Lösung einwirken.

Dementspreckend führte ich die Oxydation des Bilirubins in stark schwefelsaurer Lösung bei niederer Temperatur durch. Ich erhielt dabei das Imid der Methyläthylmaleinsäure, sowie das Imid der Hämatinsäure, neben Ammoniak, Kohlendioxyd und Ameisensäure. Die erhaltenen Mengen Maleinsäureimid waren allerdings gering. Zu einer Analyse reichten sie nicht hin; der unverkennbare Geruch und die Kristallform der wenigen Kristalle beweisen jedoch sicher die Bildung des Imids.

Beim Chlorophyll ist die Ausbeute erheblich besser,

---

[1]) Dissertation Tübingen 1907.

[2]) Liebigs Annalen 373, 227.

während man beim Hämin bis jetzt überhaupt noch kein Imid einer alkylierten Maleinsäure erhalten hat. Darnach hat es den Anschein, als ob der Gallenfarbstoff dem Chlorophyll näher stehe als dem Hämin.

4 g β-Bilirubin wurden in 100 ccm 50 %iger Schwefelsäure gelöst, indem kleine Mengen des Farbstoffs auf die Säure geschichtet und dann sich selbst überlassen wurden, bis vollständige Lösung eingetreten war. Wurde das Bilirubin in der Reibschale mit der Schwefelsäure angerieben, so traten immer erhebliche Verluste ein, dadurch, daß ein Teil des Farbstoffs verharzte und sich so der Lösung entzog.

Die erhaltene schwefelsaure Lösung wurde auf 0° abgekühlt und unter Umrühren mit der Turbine tropfenweise eine Lösung von 10 g Chromsäure in 20 ccm Wasser zugegeben. Da sich beim Eintragen der Chromsäurelösung die Flüssigkeit erwärmte, wurde das Oxydationsmittel immer nur tropfenweise zugegeben, so daß die Temperatur nie über +3° C. stieg. Nach ungefähr 1½ Stunden war die ganze Chromsäurelösung eingetragen. Die Flüssigkeit hatte sich zuletzt unter starkem Schäumen olivgrün gefärbt. Nachdem die ganze Chromsäurelösung eingetragen war, wurde noch eine Stunde lang weiter gerührt.

Das Reaktionsprodukt wurde erschöpfend mit Aether behandelt. Die ätherische Lösung wurde mit verdünnter Sodalösung ausgeschüttelt.

I. Aetherische Lösung.

Die von der Sodalösung getrennte, ätherische Lösung wurde mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet und der Aether bei niederer Temperatur abdestilliert. Es hinterblieb ein brauner Sirup, der stechend roch. Der scharfe, stechende Geruch verlor sich jedoch beim Trocknen über Natronkalk und es hinterblieb ein reiner, intensiver Geruch, der an Phenol und Jodoform erinnerte; Kristalle konnte ich in dem wachsartig erstarrten Rückstand nicht beobachten. Zur Reinigung wurde der Rückstand mit 40 % Salzsäure aufgenommen, in

der sich die harzigen Verunreinigungen zum größten Teil lösten. Der Rückstand wurde mit Aether aufgenommen, die salzsaure Lösung der Verunreinigungen ebenfalls zweimal mit Aether ausgeschüttelt und die vereinigten ätherischen Lösungen vorsichtig verdunsten gelassen. Es hinterblieben nadelförmige Kristalle, die den charakteristischen Geruch des Methyläthylmaleinimids zeigten. Zur Analyse oder Schmelzpunktsbestimmung reichten sie leider nicht hin.

II. Sodaalkalische Lösung.

Die vom Aether getrennte Sodalösung wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Aether extrahiert. Nach Abdestillieren des Aethers hinterblieb ein brauner Sirup von stark hervortretendem, stechendem Geruch. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit Wasserdampf destilliert. Die übergehende, saure Flüssigkeit reduzierte ammoniakalische Silberlösung stark.

Als nichts saures mehr überging, wurde der Rückstand mit Baryumhydroxyd alkalisch gemacht und abgedampft. Dann wurde in Salzsäure aufgenommen und ausgeäthert, der Aether vorsichtig abdestilliert. Der zurückbleibende Sirup kristallisierte nach einem Tag schön in den charakteristischen Kristallen der Hämatinsäure. Zur weiteren Identifizierung wurde das Kalziumsalz hergestellt, indem die Säure in Wasser aufgenommen und die saure Lösung mit Kalziumkarbonat geschüttelt wurde. Das Filtrat vom überschüssigen Kalziumkarbonat wurde erhitzt, wobei sich das hämatinsaure Kalzium ausschied. Ausbeute 0,87 g.

Die beim Extrahieren mit Aether zurückbleibende Flüssigkeit wurde mit Essigester erschöpfend behandelt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels hinterblieb ein brauner Sirup, der mit konzentrierter, heißer Sapetersäure behandelt wurde. Beim Erkalten schieden sich Kristalle aus, die durch den Schmelzpunkt von 182° und die Beständigkeit gegen heiße Salpetersäure als Bernsteinsäure charakterisiert wurden.

IX.

Die Oxydation des Bilirubins durch Eisenchlorid in Eisessig.

Bei der Behandlung von Bilirubin mit Eisenchlorid in essigsaurer Lösung erhält man einen in Eisessig löslichen grünen Farbstoff und einen unlöslichen schwarzen Körper.

Bei den folgenden Versuchen wurde derart verfahren, daß das Bilirubin mit Eisenchloridlösung (enthaltend 10 % Fe — 30 % $FeCl_3$) und Eisessig auf dem Wasserbade einige Stunden erwärmt wurde. Die Farbstofflösung wurde durch ein Kreppfilter filtriert und der Rückstand so lange mit Eisessig ausgekocht, bis an denselben nichts mehr abgegeben wurde, was gewöhnlich nach acht- bis zehnmaligem Auskochen der Fall war. Von den vereinigten Farbstoff-Eisessig-Lösungen wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bis auf $^1/_{10}$ abdestilliert und die konzentrierte Lösung in Wasser gegossen, wobei sich der Farbstoff ausschied. Zusatz eines Elektrolyten, wie Ammoniak oder Schwefelsäure, beschleunigte das Ausfallen des Farbstoffs,

Der abfiltrierte grüne Farbstoff wurde mit salzsäurehaltigem Wasser eisenfrei und dann mit Wasser säurefrei gewaschen. Zur Reinigung wurde er in heißem Eisessig gelöst, das Lösungsmittel bis auf einen kleinen Rest abdestilliert und der Farbstoff durch Eintragen in Wasser wieder gefällt.

Der schwarze, in Eisessig unlösliche Rückstand wurde säurefrei gewaschen, zur Entfernung etwaigen Bilirubins mit Chloroform extrahiert, dann nochmals in der Wärme mit Eisessig behandelt, bis kein grüner Farbstoff mehr in Lösung ging.

Aus folgender Tabelle sind die angewandten Mengenverhältnisse und die erzielten Ausbeuten ersichtlich.

	Bilirubin	Eisessig	Eisenchlorid Lösung 30 % $FeCl_3$	Ausbeute an grünem Farbstoff	Ausbeute an schwarzem Rückstand
I	5,0 g	500 ccm	20 ccm = 2 Atome O	2,4 g	1,7 g
II	3,0 g	300 ccm	15 ccm = Ueberschuß von 2 Atom O	1,4 g	1,2 g
III	3,0 g	300 ccm	18 ccm = 3 O	1,38 g	1,2 g
IV	5,0 g	500 ccm	30 ccm = 3 O	2,5 g	1,65 g
V	5,0 g	500 ccm	40 ccm = 4 O	2,4 g	1,7 g
VI	5,0 g	500 ccm	20 ccm = Ueberschuß von 2 Atom O	2,6 g	1,7 g
VII	5,0 g	500 ccm	„	2,7 g	1,8 g

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, genügen 2 Atome Sauerstoff auf ein Molekül Bilirubin; bessere Ausbeuten werden erhalten bei einem Ueberschuß von 2 Atomen Sauerstoff = 4 Molekülen Eisenchlorid, dagegen bringt ein größerer Ueberschuß bis zu 4 Atomen Sauerstoff keinen Vorteil.

Als günstigste Mengenverhältnisse erwiesen sich 5,0 g Bilirubin, 500 ccm Eisessig, 20 ccm Eisenchloridlösung, also auf das Molekül Bilirubin ein Ueberschuß von 2 Atomen Sauerstoff.

Die durchschnittliche Ausbeute betrug 50 % Eisessiglöslicher grüner Farbstoff und 35 % unlöslicher, schwarzer Rückstand. Durch Extraktion des schwarzen Produktes mit Chloroform konnten durchschnittlich 6 bis 7 % Bilirubin wiedergewonnen werden, so daß ein Verlust von 8 bis 9 % in

Rechnung zu bringen ist, der hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, daß verhältnismäßig viel Material an den Filtern hängen blieb und auch beim Auskochen der beiden Produkte mit Chloroform resp. Eisessig kleinere Verluste nicht zu vermeiden waren.

Bemerkenswert ist, daß nur die eine Hälfte des Bilirubinmoleküls die Umwandlung in den grünen essiglöslichen Farbstoff erfährt. Aehnlich findet H. Fischer bei der Reduktion ca. 50 % an kristallisiertem Hemibilirubin, während die zweite Hälfte eine andere Umwandlung erleidet.

Analyse des in Eisessig löslichen, grünen Produktes.

I. 0,3135 g Substanz lieferten 0,1693 g H_2O und 0,7480g CO_2 = 6,0 % H und 65,0 % C.
0,1470 g Substanz ergaben 11,8 ccm N + 18° C 752 mm = 9,1 % N.

II. 0,2493 g Substanz lieferten 0,1380 g H_2O und 0,5965 g CO_2 = 6,1 % H und 65,3 % C.
0,1742 g Substanz ergaben 12,3 ccm N + 16° C 748 mm = 9,3 % N.

III. 0,2065 g Substanz lieferten 0,1143 g H_2O und 0,4915g CO_2 = 6,1 % H und 65,2 % C.
0,1566 g Substanz ergaben 12,9 ccm N + 18° C 750 mm = 9,4 % N.

Aus diesen Zahlen lassen sich die Formeln $C_{32}H_{36}O_7N_4$ und $C_{32}H_{34}O_7N_4$ berechnen; doch scheint mir die letztere den Vorzug zu verdienen.

	Berechnet für		Gefunden		
	($C_{32}H_{36}O_7N_4$	$C_{32}H_{34}O_7N_4$	I.	II.	III.
%	65,3 C	65,5 C	65,0	65,3	65,2 C
%	6,12 H	5,8 H	6,0	6,1	6,1 H
%	9,52 N	9,5 N	9,1	9,3	9,4 N

Der Farbstoff dürfte demnach als ein Dehydrooxybilirubin anzusprechen sein.

Die Oxydation dürfte nach folgender Gleichung verlaufen sein:

$$2\ C_{32}H_{36}O_6N_4 + 6\ O = H_2O + C_{32}H_{34}O_7N_4 + C_{32}H_{36}O_{10}N_4.$$

Wie die folgenden Analysen zeigen, hat die zweite Hälfte des Bilirubins in der Tat die erwartete Menge Sauerstoff aufgenommen, da aber auch hier die Werte für Wasserstoff einen niedrigeren Gehalt an Wasserstoff ergeben, als obige Formel voraussieht, dürfte auch bei dieser Einwirkung in saurer Lösung der Sauerstoff der Luft eine Rolle spielen.

Analyse des schwarzen, in Eisessig unlöslichen Körpers.

I. 0,1645 g Substanz 0,0740 g H_2O und 0,3656 g CO_2 = 5,0 % H und 60,5 % C.
0,1400 g Substanz = 12 ccm N + 22° C 744 mm = 9,4 % N.

II. 0,2402 g Substanz 0,1095 g H_2O und 0,5341 g CO_2 = 5,06 % H und 60,6 % C.
0,1280 g Substanz 10,3 ccm N + 21° C 748 mm = 8,96 % N.

III. 0,2493 g Substanz = 0,1169 g H_2O und 0,5553 g CO_2 = 5,2 % H und 60,6 % C.
0,1163 g Substanz 9,5 ccm N + 18° C 746 mm = 9,2 % N.

Aus diesen Zahlen läßt sich die Formel $(C_{16}H_{16}O_5N_2)x$ berechnen.

Berechnet für $C_{16}H_{16}O_5N_2$		Gefunden I.	II.	III.
% 60,7	C	60,5	60,6	60,6 C
% 5,06	H	5,0	5,06	5,2 H
% 8,86	N	9,4	8,96	9,2 N

Wie ich später zeigen werde, ist dieses Produkt noch durch eine kleine Beimengung verunreinigt.

I. Ueber das Dehydrooxybilirubin.

Obwohl es bis jetzt nicht gelang, den Farbstoff kristallisiert zu erhalten, so dürfte er doch als chemisches Individuum anzusprechen sein, denn die unter den verschiedensten Bedingungen dargestellten Präparate lieferten bei der Elementaranalyse immer dieselben Werte.

Bezüglich seiner Löslichkeit in Eisessig zeigt der Farbstoff ein ähnliches Verhalten wie das Bilirubin in Bezug auf seine Löslichkeit in Chloroform; beim längeren Lagern büßt er einen Teil seiner Löslichkeit in Eisessig ein. Zum Unterschied von Bilirubin ist das Dehydrooxybilirubin in Natriumbikarbonat löslich; es ist schwer löslich in Alkohol, unlöslich in Chloroform, Petroläther, Aether, sowie siedendem Dimethylanilin.

Als Abkömmling des Bilirubins gibt es sehr schön die Gmelin'sche Gallenfarbstoff-Reaktion, sowie die Ehrlich'sche Diazo-Reaktion.

Um zu entscheiden, ob sich das Dehydrooxybilirubin durch Eisenchloridlösung weiter oxydieren läßt, wurde 1,0 g des Farbstoffs in 100 ccm Eisessig gelöst und mit 20 ccm Eisenchloridlösung auf dem Wasserbade mehrere Stunden erhitzt. Eine Aenderung der Farbe trat nicht ein. Der überschüssige Eisessig wurde abdestilliert und der Farbstoff durch Eingießen in Wasser wieder ausgefällt, abfiltriert, eisenfrei gewaschen, getrocknet und der Elementaranalyse unterworfen.

0,1157 g Substanz ergaben 0,0595 g H_2O und 0,2768 g CO_2
= 5,7 % H und 65,3 % C.

Durch die weitere Behandlung mit Eisenchloridlösung hatte sich die Löslichkeit des Farbstoffs in den oben angegebenen Lösungsmitteln nicht verändert. Das Dehydrooxybilirubin war demnach durch Eisenchlorid nicht weiter

oxydiert worden, was wieder dafür spricht, daß wir es mit einem chemischen Individuum zu tun haben.

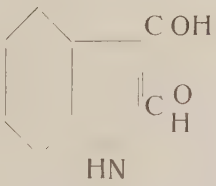
Dagegen ist es möglich, durch Salpetersäure den Farbstoff weiter zu oxydieren. Fügt man nämlich zu einer Lösung des Dehydrooxybilirubins in Eisessig einige Tropfen Salpetersäure, so schlägt die grüne Farbe der Lösung in rot um. Dies spricht auch wieder dafür, daß in dem Dehydrooxybilirubin der Farbstoff vorliegt, der bei der Gmelin'schen Callenfarbstoff-Reaktion den ersten (grünen) Ring bildet.

a) Einwirkung von Alkali auf Dehydrooxybilirubin unter Abschluß von Luft.

E. Niethammer[1]) hat die Einwirkung von Alkali auf Bilirubin studiert und ist dabei zu folgenden Resultaten gekommen:

Bei Einwirkung von Alkali auf Bilirubin in einer Wasserstoffatmosphäre bei gewöhnlicher Temperatur wird das Bilirubin nicht gespalten. Bei der Einwirkung von Alkali unter Druck auf das Bilirubin bei minimaler Zugabe eines sauerstoffgebenden Körpers, so daß die Hauptwirkung durch das Alkali erfolgte, erhielt er annähernd 40% ätherlösliche Säuren, die hauptsächlich aus Hämatinsäureanhydrid $C_8 H_8 O_5$ und Bernsteinsäure bestanden. Als weitere Spaltungsprodukte stellte er Kohlensäure, Essigsäure und als wahrscheinlich Ameisensäure fest; ferner wird $^1/_4$ des Gesamtstickstoffes als Ammoniak abgespalten.

Friedländer hat bei der Aufspaltung des Indigos durch Alkali festgestellt, daß Authranilsäure und der α-Aldehyd des β-Oxyindols



[1]) Dissertation Tübingen 1907.

sich bildet. Die Abspaltung der Anthranilsäure beim Indigo hat W. Küster in Parallele gestellt mit der Abspaltung von Hämatinsäure beim Bilirubin. Da die Einwirkung von Alkali auf Bilirubin einen viel komplizierteren Charakter trägt, als diejenige von Alkali auf Indigo, so war es nicht ausgeschlossen, daß ein bereits voroxydiertes Produkt, wie das Dehydrooxybilirubin eine glattere Aufspaltung erleiden würde, als das Bilirubin.

0,4400 g Farbstoff wurde mit einem starken Ueberschuß von Kaliumhydroxyd in 250 ccm Wasser gelöst und unter Durchleiten von Wasserstoff eine Stunde im Kjeldahl-Apparat gekocht. Das Destillat wurde in $\frac{n}{10}$ Schwefelsäure aufgefangen. Durch das Kaliumhydroxyd wird ein Teil des Stickstoffs als Ammoniak abgespalten. Die abgespaltene Menge Ammoniak entsprach 7,5 ccm $^1/_{10}$ N-Schwefelsäure = 7,5 $^1/_{10}$ N-Ammoniak. Da 0,4400 g Dehydrooxybilirubin mit 9,5 % Stickstoff angewandt wurden, so sind 2,4 % Stickstoff oder $^1/_4$ des Gesamtstickstoffes als Ammoniak abgespalten worden.

Die zurückbleibende, stark alkalische Lösung gab an Aether nichts ab. Sie wurde nun unter Zusatz einer Spur Natriumsuperoxyd eine Stunde lang weiter gekocht; weitere Ammoniakabspaltung trat nicht ein; dann wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf destilliert, wobei sich allmählich ein Niederschlag bildete. Das Destillat reagierte sauer.

I. Destillat.

Das saure Destillat wurde mit Baryumhydroxyd alkalisch gemacht und nochmals mit Wasserdampf destilliert.

A. Das Destillat reduzierte stark ammoniakalische Silberlösung, was auf die Anwesenheit eines Aldehydes schließen ließ; Fehlingsche Lösung wurde nicht reduziert. Fuchsinschweflige Säure gab schwache Reaktion. Der reduzierende Körper ging aus der wässerigen Lösung beim Ausschütteln in Aether über; dieser ätherischen Lösung konnte er durch konzentrierte Natriumbisulfitlösung entzogen werden.

B. Der alkalische Rückstand wurde von dem entstandenen Barytniederschlag abfiltriert, der Rückstand in Salzsäure gelöst, die Lösung samt Filtrat ausgeäthert und der Aether im Vakuum verdunstet. Der Rückstand zeigte den charakteristischen Geruch von dialkylierten Maleinsäuren.

II. Der Rückstand der ersten Wasserdampfdestillation

wurde vom suspendierten Niederschlag durch Filtration getrennt und das

A-Filtrat stark eingeengt und mit Aether extrahiert. Zwecks Trennung eines eventuell anwesenden Aldehyds wurde der ätherische Auszug mit 5 %igem Ammoniak ausgeschüttelt, um Säuren, wie Hämatinsäure, zu binden.

a) Die ätherische Lösung wurde abdestilliert, es hinterblieb ein brauner, sirupartiger Rückstand; er wurde in Wasser gelöst und mit Phenylhydrazin und Essigsäure auf dem Wasserbade erwärmt. Es trat starke Gelbfärbung ein. Da jedoch keine kristallinische Ausscheidung erfolgte, wurde die wässerige Lösung mit Petroläther ausgeschüttelt. Die gelbe Farbe ging in den Petroläther über. Zur Kontrolle wurde Phenylhydrazin mit Essigsäure längere Zeit auf dem Wasserbade erhitzt und mit Petroläther ausgeschüttelt. Hierbei blieb jedoch der Petroläther farblos. Die Petrolätherlösung hinterließ beim Verdampfen an der Luft Kristalle, die die Bülowsche Reaktion gaben.

b) Die ammoniakalische Lösung wurde mit Schwefelsäure wieder sauer gemacht und mit Aether erschöpfend extrahiert. Die Ausbeute betrug ca. 0,2 g Rohsäure. Zwecks Reinigung wurde dieselbe in Wasser aufgenommen, filtriert und das Filtrat mit Kalziumkarbonatschlamm bis zur Neutralisation geschüttelt. Dann wurde abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbade erwärmt. Es entstand ein Niederschlag, der abfiltriert uud mit heißem Wasser ausgewaschen wurde dann wurde er auf dem Filter in verdünnter Salzsäure gelöst

und die salzsaure Lösung mit Aether extrahiert. Beim Verdunsten des Aethers hinterblieben schön ausgebildete Kristalle von Hämatinsäure.

B. Rückstand. Derselbe wurde säurefrei gewaschen; leider war seine Menge so gering, daß sie zu näherer Untersuchung nicht ausreichte. Doch gab er keine Gallenfarbstoff-Reaktion mehr.

Aus Mangel an Material mußte ich es unterlassen, den Versuch mit größeren Mengen zu wiederholen. Voraussichtlich wird derselbe wichtige Aufklärung über die Konstitution des Dehydrooxybilirubins bezw. des Bilirubins bringen.

b) Ueber die Einwirkung von Cyankali auf Dehydrooxybilirubin.

Bei der Feststellung der Löslichkeit von Dehydrooxybilirubin in Cyankalium zeigte es sich, daß 2 Moleküle des letzteren zur vollständigen Lösung nicht ausreichten, erst bei Anwendung von 3 Molekülen Cyankalium fand vollständige Lösung statt.

Demzufolge wurde 1,0 g des Farbstoffs mit Hilfe von 0,22 g Cyankali in 250 ccm Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft, noch zweimal mit Wasser aufgenommen und wieder abgedampt. Die Lösung wurde filtriert und ausgeäthert. In den Aether ging anscheinend nur wenig über. Um aber einen event. vorhandenen Körper mit Aldehydnatur zu fassen, wurde der Aether mit konzentrierter Natrium-Bisulfitlösung geschüttelt. Die Bisulfitlösung wurde dann mit Barytwasser im Ueberschuß versetzt und mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat reduzierte in der Tat Nessler's Reagens.

Die mit Aether erschöpfend extrahierte Dehydrooxybilirubin-Cyankalium-Lösung wurde dann mit Schwefelsäure angesäuert. Ein Geruch nach Blausäure war nicht wahrzunehmen.

Von dem entstandenen Niederschlag wurde abfiltriert, er

betrug, säurefrei gewaschen, 0,7 g. Auch bei längerem Kochen des Niederschlages mit Schwefelsäure am Rückflusskühler war eine Abspaltung von Cyanwasserstoff nicht nachzuweisen.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab:

0,2117 g Substanz lieferten 14,5 ccm $^1/_{10}$ N-Ammoniak, was einem Stickstoffgehalt von 9,6 % entspricht.

Das saure Filtrat wurde ausgeäthert; die braungelbe, ätherische Lösung wurde mit 3%igem Ammoniak ausgeschüttelt, wobei die braungelbe Farbe in das Ammoniak überging.

A. Ammoniakalische Lösung. Das überschüssige Ammoniak wurde auf dem Wasserbade verjagt und die Lösung mit überschüssigem Barytwasser versetzt. Zur Entfernung überschüssigen Baryums wurde in der Wärme, Kohlendioxyd eingeleitet und vom entstandenen Baryumkarbonat abfiltriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade konzentriert. Hierbei schied sich ein Niederschlag ab der abfiltriert wurde; er wurde mit heißem Wasser ausgewaschen, in Salzsäure gelöst und die saure Lösung mit Aether extrahiert. Nach dem Verdampfen des Aethers hinterblieb ca. 0,1 g Hämatinsäure, die in den charakteristischen Formen kristallisierte.

Das mit Aether extrahierte, saure Filtrat wurde nun im Apparat mit Essigester erschöpfend ausgezogen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels hinterblieb ein brauner Sirup, der mit heißer, konzentrierter Salpetersäure zweimal behandelt wurde. Beim Erkalten der Salpetersäure schieden sich Kristalle aus, die durch den Schmelzpunkt 182° und ihre Beständigkeit gegen heiße Salpetersäure als Bernsteinsäure charakterisiert wurden.

B. Aetherische Lösung. Der Aether wurde im Vakuum vorsichtig abgedampft. Der Rückstand zeigte den charakteristischen Geruch des Methyläthylmalein-Imids. Zur Schmelzpunktsbestimmung reichte die erhaltene Ausbeute leider nicht hin.

c) Ueber die Salze des Dehydrooxybilirubins.

Kaliumsalz. Für den Fall, daß das Dehydrooxybilirubin, wie das Bilirubin, auf $C_{32} H_{34} O_7 N_4$ zwei Carboxyle besitzt, verlangt 1,0 g des Farbstoffs 34,1 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge zur Lösung.

3,0040 g Dehydrooxybilirubin wurden mit 105 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge und 300 ccm destilliertem Wasser versetzt und zwei Stunden im Apparat geschüttelt Dann wurde filtriert und der Rückstand nochmals mit 200 ccm Wasser geschüttelt, wobei wieder ein Teil des Farbstoffs in Lösung ging. Das Ungelöste wurde mit Wasser ausgewaschen und getrocknet; seine Menge betrug 0,3210 g, also ungefähr 10 % des in Arbeit genommenen Dehydrooxybilirubins. Es hatten sich also ursprünglich 2,683 g Farbstoff in 105 ccm $\frac{n}{10}$ Kalilauge gelöst, oder 586 g in 2293 ccm Kalilauge, d. h. ein Molekül Dehydrooxybilirubin verlangt $2^1/_4$ Moleküle Kaliumhydroxyd. Doch zeigte es sich, daß das erhaltene Kaliumsalz freies Alkali enthielt, das durch Alkohol entfernt werden konnte.

Die filtrierte Lösung des Kaliumsalzes wurde im Vakuum unter Durchleiten von Wasserstoff eingedampft, wobei sich das Kaliumsalz in schwarzen, glänzenden Lamellen abschied, nachdem ein Versuch, das Salz durch Eingießen der konzentrierten, wässerigen Lösung in Alkohol zu gewinnen, ergebnislos verlaufen war.

Das auf diesem Wege gewonnene Kaliumsalz wies natürlich einen höheren Wert für K auf, als sich für die Formel $C_{32} H_{32} K_2 O_7 N_4$ berechnet.

0,3410 g Kaliumsalz wurden in 100 ccm Wasser gelöst und mit verdünnter Salzsäure versetzt, solange ein Niederschlag entstand. Der ausgefällte Farbstoff wurde abfiltriert, sorgfältig salzsäurefrei gewaschen und das Filtrat samt Waschwässern zur Trockene verdampft und geglüht. Es wurden 0,0925 g K Cl = 14,1 % K erhalten.

Berechnet für $C_{32} H_{32} K_2 O_7 N_4$ = 11,9 % K.

Zur Entfernung des überschüssigen Kaliumhydroxyds wurde das obige Kaliumsalz fein zerrieben und mit 96 %igem Alkohol 24 Stunden geschüttelt. Der Alkohol reagierte nach dem Filtrieren stark alkalisch.

Analyse.

0,2135 g Substanz ergaben 0,0478 g K Cl = 11,8 % K.

Demnach dürfte auch das Dehydrooxybilirubin als 2basische Säure anzusehen sein.

Es wurde nun eine Lösung von 1,0145 g Dehydrooxybilirubin in 40 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge + 300 ccm Wasser der Dialyse unterworfen gegen 500 ccm Außenwasser.

Nach 24 Stunden: Das Außenwasser war ganz schwach gefärbt und reagierte schwach alkalisch. Zur Neutralisation waren 1,1 ccm $^1/_{10}$ N-Schwefelsäure nötig.

Nach 48 Stunden: Zur Neutralisation des ausgetretenen Alkalis waren 0,8 ccm $^1/_{10}$ N-Schwefelsäure nötig.

Nach 72 Stunden: Zur Neutralisation waren 0,3 ccm $^1/_{10}$ N-H_2SO_4 nötig.

Nach 96 Stunden trat kein Alkali mehr aus; das Außenwasser reagierte neutral.

Theoretisch wären zur Lösung der 1,0145 g Farbstoff 34,6 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge nötig gewesen. Es war also ein Ueberschuß von 5,4 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge versandt worden; davon traten 2,2 ccm bei der Dialyse in das Außenwasser; auf 586 g Dehydrooxybilirubins kommen demnach

$$\frac{586 \cdot 37{,}8}{1{,}0145 \cdot 10} = 2{,}18 \text{ Moleküle Kaliumhydroxyd.}$$

In die dialysierte Farbstofflösung wurde nun Kohlensäure eingeleitet. Auch nach stundenlangem Einleiten von Kohlendioxyd schied sich der Farbstoff nicht aus. Aus einer Bilirubinkaliumlösung wird der Farbstoff beim Einleiten von Kohlensäure abgeschieden. Das Dehydrooxybilirubin ist demnach eine stärkere Säure als Kohlendioxyd.

Die dialysierte Lösung des Kaliumsalzes wurde nun im

Vakuum unter Durchleiten von Wasserstoff konzentriert. Das ausgeschiedene Kaliumsalz ergab bei der Analyse:

0,1632 g Substanz ergaben 0,0379 g KCl = 12,2 % K.

Baryumsalz. 1,0 g Dehydrooxybilirubin wurde in 40 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge + 300 ccm Wasser gelöst und die filtrierte Lösung mit 9 ccm einer Chlorbaryumlösung 1 : 12 (= Ueberschuß von 1 Atom Ba auf $C_{32} H_{34} K_2 O_6 N_4$) versetzt.

Das abgeschiedene Baryumsalz wurde durch Auswaschen von überschüssigem Baryum befreit und bei 105° getrocknet. Ausbeute 1,0 g Baryumsalz (theoretisch 1,24 g). Das Filtrat vom abgeschiedenen Farbstoff war stark grün gefärbt; auf weiteren Zusatz von Chlorbaryum entstand jedoch kein Niederschlag.

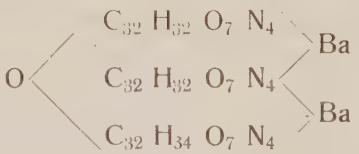
Analyse.

I. 0,2327 g Substanz 0,1115 g H_2O und 0,4530 g CO_2
= 5,3 % H und 53,1 % C.
ferner 0,0567 g $BaSO_4$ = 14,4 % Ba.

Berechnet für $C_{32} H_{32} Ba O_7 N_4$		Gefunden	
	%		%
C	= 53,25	C	= 53,1
H	= 4,43	H	= 5,3
Ba	= 19,00	Ba	= 14,4 / 14,6 } 14,5

Es ist aber anzunehmen, daß das Baryumsalz noch etwas Kaliumsalz enthielt, wodurch sich C und O weniger ändern als Ba.

Den gefundenen Werten kommt ein Salz der Formel



noch am nächsten. Für dasselbe berechnet sich

52,3 % C 4,7 % H 13,7 % Ba.

Um ein Salz mit dem berechneten Baryumgehalt von 19 % zu bekommen, stellte ich nochmals ein Baryumsalz her, indem ich in der Hitze arbeitete, sonst aber die oben angegebenen Bedingungen einhielt. Das so dargestellte Baryumsalz hatte jedoch einen noch geringeren Baryumgehalt.

Analyse.

0,2755 g Substanz lieferten 0,0595 g $BaSO_4$ = 12,7 % Ba.

Eisensalz. 1,0 g Dehydrooxybilirubin wurde in 40 ccm 1/10 N-Kalilauge + 300 ccm Wasser gelöst. Die filtrierte Lösung wurde im Vakuum zur Trockene verdampft, der erhaltene Farbstoff mit 250 ccm Alkohol 24 Stunden lang geschüttelt und abfiltriert.

1,0 g des des erhaltenen Kaliumsalzes wurden in 200 ccm Wasser gelöst und die filtrierte Lösung mit einer ebenfalls filtrierten Lösung von 1,6 g Ferroammoniumsulfat in 200 ccm Wasser versetzt.

Das erhaltene Eisensalz schied sich sehr rasch und vollkommen aus der Lösung ab; das Filtrat enthielt keinen Farbstoff. Er war in Wasser unlöslich, löste sich jedoch auf Zusatz von Ammoniak, Natronlauge, Natronkarbonat. Beim Stehen mit überschüssigem Alkali wird das Eisen aus dem Salze abgespalten.

Ausbeute: 1,1 g Eisensalz.

Analyse.

0,2154 g Substanz gaben 0,1032 g H_2O und 0,4873 g CO_2 = 5,3 % H und 61,7 % C.
sowie 0,0185 g Fe_2O_3 = 6,0 % Fe.

Berechnet für $C_{32}H_{32}FeO_7N_4$	Gefunden
%	%
C = 60,0	61,7 C
H = 5,0	5,3 H
Fe = 8,7	6,0 Fe

Hier liegt wohl ein Gemisch von Kaliumsalz und Eisen-

salz vor. Ein Salz der Formel $C_{96}H_{96}O_{20}N_{12}Fe_2$ hätte einen Fe-Gehalt von 6,04 %.

Magnesiumsalz. 1,5 g Dehydrooxybilirubin wurde mit 40 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge und 300 ccm Wasser versetzt und sechs Stunden im Apparat geschüttelt. Dann wurde vom ungelösten Farbstoff abfiltriert und die neutrale Lösung mit einer filtrierten Lösung von 1,0 g kristallisiertem Magnesiumsulfat in 100 ccm Wasser versetzt. (Ueberschuß 1 Atom Mg auf $C_{32}H_{34}O_7N_4$, da 1,1 g Farbstoff in Lösung gegangen war.)

Das Magnesiumsalz schied sich nur schwer ab; das Filtrat war dunkelgrün gefärbt.

Ausbeute 1,0 g Magnesiumsalz.

Analyse.

0,1425 g Substanz gaben 0,0670 g H_2O und 0,3322 g CO_2 = 5,26 % H und 63,56 % C
ferner 0,0200 $Mg_2P_2O_7$ = 2,9 % C.

Berechnet für $C_{32}H_{32}MgO_7N_4$		Gefunden
	%	%
C	= 63,1	63,56 C
H	= 5,2	5,26 H
Mg	= 3,9	2,9 Mg

Silbersalz. 1,5 g Dehydrooxybilirubin, 40 ccm $^1/_{10}$ N-Kalilauge und 500 ccm Wasser einige Stunden geschüttelt und filtriert. 1,1 g Farbstoff ging in Lösung; dieselbe reagierte neutral. Sie wurde nun bei Zimmertemperatur mit einer heiß bereiteten und wieder erkalteten Lösung von 2,2 g Silbersulfat in 300 ccm Wasser versetzt. Das Silbersalz schied sich nur sehr langsam aus; erst nach zwei Tagen war ein merklicher Niederschlag entstanden; er wurde abfiltriert und das stark gefärbte Filtrat nochmals mit einer Lösung von 1,0 g Silbersulfat in 150 ccm Wasser versetzt. Es bildete sich jedoch kein weiterer Niederschlag.

Ausbeute 0,6 g Silbersalz.

Analyse.

0,2005 g Substanz gaben 0,0632 g H_2O und 0,2992 g CO_2
= 3,6 % H und 40,7 % C
0,0616 g Ag = 30,7 % Ag.

Ich stellte nun ein zweites Silbersalz her unter den gleichen Bedingungen wie oben, nur daß die Fällung in der Siedehitze vorgenommen wurde. Der Niederschlag schied sich noch schwerer ab, als in der Kälte. Das Filtrat war ebenfalls stark dunkel gefärbt.

Analyse.

0,2100 g Substanz gaben 0,0630 g H_2O und 0,3040 g CO_2
= 3,3 % H und 39,5 % C
0,0730 g Ag = 34,7 % Ag.

Es berechnet sich für:

	%	%	%
$C_{32} H_{32} Ag_2 O_7 N_4$	4,0 H	48,0 C	27,0 Ag
$C_{32} H_{31} Ag_3 O_7 N_4$	3,4 H	42,3 C	35,7 Ag
$C_{32} H_{30} Ag_4 O_7 N_4$	2,9 H	37,8 C	42,5 Ag

Gefunden:

	%	%	%
I. Kalt gefällt	3,6 H	40,7 C	30,7 Ag
II. Heiß gefällt	3,3 H	39,5 C	34,7 Ag

Den bei der Analyse des heiß gefällten Salzes erhaltenen Zahlen kommt am nächsten ein Salz der Formel

$C_{32} H_{32} Ag_2 O_7 N_4 \cdot Ag OH$ mit 41,4 % C 3,57 % H.
35,03 % Ag.

Das heiß gefällte Salz entspricht im Silbergehalt fast der 2. Formel. Es können hier also 3 Atome Silber eintreten, beim Bilirubin dagegen fast 4.

Ich versuchte nun, das Dehydrooxybilirubin aus seinen Salzen zu regenerieren, um die Frage zu entscheiden, ob sich die Salze vom Dehydrooxybilirubin oder von einem anderen Körper herleiten.

Zu diesem Zwecke zersetzte ich das Kaliumsalz, in Wasser gelöst, durch Salzsäure und wusch den ausgeschiedenen Farbstoff sorgfältig aus. Derselbe löste sich in Eisessig mit tiefgrüner Farbe, ebenso in Bikarbonat, dagegen schwer in Alkohol, er war unlöslich in Chloroform, Petroläther, Aether, sowie siedendem Dimethylanilin. Dieselben Löslichkeitsverhältnisse zeigte der von dem Magnesiumsalz durch Zersetzen mit Essigsäure gewonnene Farbstoff.

Analyse.

0,1590 g Substanz gaben 0,0735 g H_2O und 0,3798 g CO_2
$= 5{,}3\,\%$ H $65{,}2\,\%$ C.

Berechnet für $C_{32}\,H_{34}\,O_7\,N_4$ 65,5 % C 5,8 % H.

Demnach läßt sich das Dehydrooxybilirubin aus seinen Salzen regenerieren, zum Unterschied von Bilirubin, bei dem das nicht möglich ist.

II. Ueber das Bilinigrin.

Für den bei der Oxydation von Bilirubin mit Eisenchlorid und Eisessig erhaltenen, unlöslichen schwarzen Rückstand, möchte ich den Namen „Bilinigrin" vorschlagen.

Das Bilinigrin kristallisiert zu erhalten, ist bis jetzt noch nicht gelungen, wohl deshalb, weil noch kein geeignetes Lösungsmittel für dasselbe gefunden worden ist. In den gebräuchlichen, indifferenten Lösungsmitteln wie Alkohol, Aether, Azeton, Chloroform, Petroläther, Methylalkohol, Dimethylanilin ist das Bilinigrin so gut wie unlöslich. Dagegen gelang es, diesen schwarzen Farbstoff durch sein unlösliches Natriumsalz zu charakterisieren. Dieser Befund wurde bei dem Versuch gemacht, das Bilinigrin in Alkalisalze überzuführen.

Versuch betr. die Löslichkeit in kohlensaurem Alkali. 0,5 g Bilinigrin wurden mit 10 ccm Normalnatriumkarbonat und 50 ccm Wasser eine Stunde lang in der Kälte geschüttelt und dann filtriert. Der sehr beträchtliche Rück-

stand wurde mit Wasser ausgekocht; nach 5maligem Auskochen gab er an Wasser nichts mehr ab, worauf er bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion mit heißem Wasser gewaschen wurde. Als dann das braun gefärbte Filtrat samt den Waschwässern mit 10 ccm Normal-Salzsäure versetzt wurde, schied sich in der Tat nur sehr wenig Farbstoff ab. Er wurde filtriert und bis zum Verschwinden der Salzsäurereaktion gewaschen. Das Filtrat, vereinigt mit den Waschwässern, wurde mit Normal-Kalilauge titriert, wobei noch 1,6 ccm gebraucht wurden. Es waren also nur 8,4 ccm N-Salzsäure für das angewendete Natriumkarbonat verbraucht worden, oder 1,6 ccm N-Natriumkarbonat mußten noch in dem schwarzen, unlöslichen Rückstand gebunden sein. Da dieser das Aequivalent-Gewicht 316 besitzt und auf 0,5 g 1,6 ccm verbraucht waren, mußte gerade 1 Natrium eingetreten sein.

Ich versuchte nun mit Hilfe dieses schwer löslichen Natriumsalzes das Bilinigrin zu reinigen, da das in Lösung gegangene Natriumsalz aller Wahrscheinlichkeit nach eine Beimengung darstellte. Es wurden deshalb 5,4 g des schwarzen Körpers mit überschüssigem Natriumkarbonat geschüttelt und abfiltriert. Das erhaltene Natriumsalz wurde mit Wasser ausgekocht, bis die Lösung nahezu farblos erschien.

Der unlösliche Rückstand wurde auf seinen Natriumgehalt hin untersucht.

1,02 g des Natriumsalzes wurde mit Salzsäure geschüttelt, dann wurde abfiltriert und sorgfältig ausgewaschen. Die salzsaure Lösung wurde vorsichtig zur Trockene verdampft und der Rückstand geglüht. Es blieben 0,1763 g NaCl zurück, was einem Natrimgehalt von 6,7 % entspricht.

Für $C_{16}\,H_{15}\,Na\,O_5\,N_2$ berechnet sich 6,8 % Natrium.

Es wurden nun die noch übrigen 4,4 g des Natriumsalzes ebenfalls, um die Säure in Freiheit zu setzen, mit Salzsäure behandelt, und der so gereinigte Körper der Analyse unterworfen.

Analyse.

0,1940 g Substanz gaben 0,0768 g H_2O und 0,4238 g CO_2 = 4,5 % H und 60,0 % C

0,1710 g Substanz gaben 13 ccm N + 22° C 740 mm = 8,3 % N.

Analog dem Natriumsalz verhält sich das Kaliumsalz.

0,5 g Bilirubin wurde mit einem Ueberschuß von Kaliumkarbonat und 10 ccm Wasser eine Stunde lang bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt und dann abfiltriert. Der sehr beträchtliche Rückstand wurde mit Wasser ausgekocht, was sechsmal wiederholt werden mußte, worauf er bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion mit heißem Wasser gewaschen wurde. Beim Ansäuern der braun gefärbten Filtrate schied sich nur wenig Farbstoff aus. Es wurden 0,53 g Kaliumsalz erhalten. Zur Bestimmung des Kaliumgehaltes wurden diese 0,53 g Kaliumsalz mit Salzsäure zersetzt, der Rückstand säurefrei gewaschen und das Kalium als Chlorkalium gewogen. Es wurden 0,1112 KCl erhalten = 11 % Kalium.

Das im Wasser lösliche Natriumsalz wurde durch Schwefelsäure zersetzt, der Niederschlag abfiltriert und dann säurefrei gewaschen. Das Filtrat wurde alkalisch gemacht, auf ein kleines Volumen eingedampft, wieder angesäuert und ausgeäthert. Es hinterblieb eine geringe Menge eines braunen Sirups, der sich in Wasser löste; die filtrierte Lösung wurde mit Kalzium-Karbonat-Schlamm geschüttelt, von ungelöstem Kalziumkarbonat abfiltriert und erwärmt. In der Hitze schied sich eine kleine Menge eines Salzes aus, das an der Kristallform als hämatinsaures Kalzium erkannt wurde. Durch das Auskochen mit Wasser und beim Eindampfen war also wie beim Bilirubin eine weitgehende Zersetzung eingetreten. Zur Orientierung wurde die noch vorhandene kleine Menge des aus dem wasserlöslichen Natriumsalz sich bildenden Farbstoffs der Elementaranalyse unterzogen.

Analyse.

0,1130 g Substanz 0,0550 g H_2O und 0,2621 g CO_2 = 5,4 % H und 63,4% C.

Danach dürfte hier Biliverdin vorliegen.

Berechnet für $C_{16} H_{18} O_4 N_2$	Gefunden
%	%
C = 63,5	63,4 C
H = 5,9	5,4 H